



DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

# **CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE BEBIDAS COMERCIAIS**

## **DISSERTAÇÃO**

RAQUEL BARBOSA QUEIRÓS

Mestrado em Engenharia Química  
Ramo Tecnologias de Protecção Ambiental  
Setembro 2008

# **Capacidade Antioxidante de Bebidas Comerciais**

**Autora:**

**Raquel Barbosa Queirós**

**Orientadora:**

**Professora Doutora Maria Goreti Ferreira Sales**

*Esta publicação não pode ser reproduzida nem transmitida, no seu todo ou em parte, por qualquer processo aleatório, mecânico, fotocópia, gravação ou outra, sem prévia autorização escrita do autor.*

## Agradecimentos

Em primeiro lugar à minha orientadora, à Professora Doutora Maria Goreti Sales, por ter aceite orientar este trabalho, pela sua disponibilidade e apoio prestado; por ter partilhado comigo alguma da sua experiência e conhecimentos científicos e acima de tudo por ser uma boa amiga.

À Dra Cristina Matos por ter permitido desenvolver este trabalho no Grupo de Reacção e Análise Química (GRAQ).

Ao Engenheiro Vítor Freire por ter disponibilizado todo o equipamento necessário às análises de capacidade antioxidante.

À Engenheira Fátima Barroso, por estar sempre disponível para esclarecer uma ou outra dúvida.

À Felismina por todo o auxílio no trabalho de laboratório e na compreensão dos resultados.

Aos colegas de laboratório, Rafaela, Vera e Ayman, pelo vosso contributo para um bom ambiente de trabalho.

Aos meus pais, por acreditarem em mim e no meu trabalho, pela compreensão e pela disponibilidade em financiar os meus estudos por este longo período.

À minha irmã, Inês, por me dispensar das tarefas domésticas, neste tempo de imenso trabalho.

Ao Miguel, pelo carinho, por compreender e aturar este meu géniozinho e por me fazer acreditar que posso ser, em tudo, melhor.

À Paula, companheira das longas horas passadas no laboratório, dos dez minutos que tínhamos para almoçar e de todos os momentos, estiveste sempre lá! Pela especial contribuição dos resultados da cerveja e por toda a ajuda que dispensaste sempre que precisei. Uma amiga para a vida.

Obrigada a todos!

## Resumo

O presente trabalho pretende avaliar a capacidade antioxidante (CA) de bebidas comerciais. O valor de CA poderá fornecer informações quanto ao grau de protecção conferido ao organismo relativamente a processos de dano oxidativo celular, visto que a CA traduz o potencial de inibição de processos de oxidação.

Foram analisadas 50 amostras das quais 6 eram referentes a vinhos, 18 eram de bebidas refrigerantes, 14 eram águas naturais e aromatizadas e 12 eram referentes a cervejas.

A determinação da CA foi realizada por três métodos ópticos, *Total Radical trapping Antioxidant Parameter* (TRAP), *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) e *Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter* (FRAP). O método TRAP é um método cuja determinação analítica envolve reacções de transferência de átomos de hidrogénio, enquanto que o TEAC e o FRAP envolvem reacções de transferência de electrões.

Os resultados foram calculados em função de três antioxidantes (AOs) de referência, Ácido Ascórbico (AA), Ácido Gálico (AG) e o Trolox.

Os resultados foram avaliados relativamente aos constituintes das amostras, como por exemplo, a presença de gás, de aromas, de conservantes, de corantes, de AOs, de vitaminas e outros aditivos, relativamente ao método e padrão utilizados na determinação da CA, e relativamente à marca e ao tipo de bebida.

Os estudos baseados no teste Anova sugerem que de uma forma geral, os métodos e os padrões podem produzir diferenças estatisticamente significativas. Para as bebidas refrigerantes os factores que se revelam importantes são o aroma, o regulador de acidez, o teor de sumo e a cor. Para as águas os factores que mais influenciam os valores de CA foram os aromas e os AOs. Para as cervejas foi o tipo de cerveja. E para o vinho nenhum dos factores analisado é determinante na avaliação da CA.

**Palavras-Chave:** Capacidade Antioxidante, TRAP, TEAC, FRAP, AA, AG, Trolox, Água, Vinho, Cerveja, Refrigerantes.

## Abstract

In this work, antioxidant capacities (CA) of general drinks were evaluated. The values of CA can provide some information about the level of protection exerted to the organism in case of oxidative cellular damaged.

The present work reports the analysis of 50 samples. 6 wines, 18 soft drinks, 14 natural and flavoured waters and 12 beers. CA were determined by means of three optical methods, *Total Radical trapping Antioxidant Parameter* (TRAP), *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) e *Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter* (FRAP). The analytic determination of TRAP involves the transfer of hydrogen atoms while TEAC and FRAP involves electron's transfer reactions.

The values of CA were calculated according to three antioxidants of reference, *Ascorbic acid* (AA), *Galic acid* (AG) and *Trolox*. The results obtained were analyzed with regard to samples constituents, for example, gas, flavours, preservatives, antioxidants, vitamins and other additives, relatively to methods and standards and relatively to trademarks and drink types.

The studies based on Anova test suggest, in general, that methods and standards exhibit significant statistical differences. Flavour, acidity regulators, content of juice and colour were the analyzed factors in soft drinks. For waters, flavours and antioxidants were considered and for beers was the type of beers that was studied. In what concerns to wine, none of variables that were analyzed had any preponderance in the evaluation of CA.

**Key-words:** Antioxidant Capacity, TRAP, TEAC, FRAP, AA, AG, Trolox, Water, Wine, Beer, Soft Drinks.

## Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Stress Oxidativo .....	1
1.1.1	Espécies reactivas de oxigénio.....	2
1.1.2	Defesas antioxidantes .....	4
1.2	Quantificação da CA.....	7
1.2.1	FRAP, Ferric Ion Reducing Antioxidant Parameter .....	8
1.2.2	TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity .....	8
1.2.3	TRAP, Total Radical Trapping Antioxidant Parameter .....	9
1.3	Bebidas .....	9
1.3.1	Águas .....	9
1.3.1.1	Águas aromatizadas .....	11
1.3.2	Cervejas .....	11
1.3.2.1	Processo de Fabrico .....	12
1.3.2.2	Principais características.....	12
1.3.2.3	Benefícios para a saúde .....	13
1.3.3	Refrigerantes.....	15
1.3.4	Vinhos .....	17
1.3.4.1	Benefícios para a saúde .....	18
1.4	Objectivos do trabalho.....	19
2	Descrição Experimental.....	20
2.1	Amostras .....	20
2.2	Equipamento e Material.....	20
2.3	Reagentes.....	21
2.4	Procedimentos .....	22
2.4.1	TRAP.....	22
2.4.2	TEAC.....	22
2.4.3	FRAP.....	22
3	Resultados e Discussões.....	23
3.1	Caracterização das amostras.....	23
3.2	Determinação da capacidade antioxidante .....	32
3.2.1	Refrigerantes.....	32
	Tabela 4 – Valores da CA para as amostras de refrigerante para os vários métodos e padrões. ....	33
3.2.2	Vinhos .....	34
3.2.3	Águas .....	35

3.2.4	Cervejas .....	37
3.3	Influência de alguns factores na CA .....	38
3.3.1	Refrigerantes.....	39
3.3.1.1	Efeito da marca comercial.....	39
3.3.1.2	Efeito dos aromas .....	40
3.3.1.3	Efeito da presença de gás .....	42
3.3.1.4	Efeito dos corantes .....	43
3.3.1.5	Efeito dos edulcorantes .....	44
3.3.1.6	Efeito dos reguladores de acidez .....	45
3.3.1.7	Efeito dos conservantes.....	47
3.3.1.8	Efeito dos estabilizantes .....	48
3.3.1.9	Efeito das vitaminas.....	49
3.3.1.10	Efeito do teor de sumo .....	50
3.3.1.11	Efeito da cor.....	52
3.3.1.12	Efeito do método.....	53
3.3.1.13	Efeito do padrão.....	56
3.3.2	Vinho .....	60
3.3.2.1	Efeito do tipo de vinho (Denominação) .....	60
3.3.2.2	Efeito da presença de gás .....	61
3.3.2.3	Efeito do teor de álcool .....	62
3.3.2.4	Efeito do método.....	63
3.3.2.5	Efeito do padrão .....	65
3.3.3	Águas .....	66
3.3.3.1	Efeito da marca comercial.....	66
3.3.3.2	Efeito dos aromas.....	67
3.3.3.3	Efeito dos edulcorantes .....	68
3.3.3.4	Efeito dos conservantes.....	69
3.3.3.5	Efeito das vitaminas.....	70
3.3.3.6	Efeito do antioxidante .....	72
3.3.3.7	Efeito do método.....	73
3.3.3.8	Efeito do padrão .....	74
3.3.4	Cerveja.....	77
3.3.4.1	Efeito da marca comercial.....	77
3.3.4.2	Efeito do tipo de cerveja .....	78
3.3.4.3	Efeito dos corantes .....	79
3.3.4.4	Efeito do teor de álcool .....	80
3.3.4.5	Efeito da cor.....	81



3.3.4.6	Efeito do método.....	82
3.3.4.7	Efeito do padrão .....	85
4	Conclusões.....	89
5	Referências Bibliográficas .....	91

## *Documento Anexo*

### **Índice dos Anexos**

Anexo A	
	Análise estatística descritiva das amostras.....1
Anexo B	
	Valores de CA para o método FRAP ao longo do tempo.....8
Anexo C	
	Resultados relativos a refrigerantes.....25
Anexo D	
	Resultados relativos a vinhos.....41
Anexo E	
	Resultados relativos a águas.....47
Anexo F	
	Resultados relativos a cervejas.....54

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Fontes e respostas celulares às espécies reactivas [4].....	4
<b>Figura 2</b> – Estrutura da vitamina E, ou tocoferol, com os vários grupos R.[6].....	6
<b>Figura 3</b> – Estrutura da vitamina C ou ácido ascórbico [7].....	6
<b>Figura 4</b> - Reacção de formação do catião ABTS [9].....	8
<b>Figura 5</b> – Principais matérias primas da cerveja, lúpulo e cereais maltados. [9]. ....	13
<b>Figura 6</b> – Consumo anual de vinho por habitante [18]. ....	18
<b>Figura 7</b> – Vinho tinto e branco [18]. ....	19
<b>Figura 8</b> – Distribuição percentual das amostras segundo a categoria das bebidas.....	24
<b>Figura 9</b> – Distribuição percentual das amostras segundo a denominação das bebidas.....	24
<b>Figura 10</b> – Distribuição percentual das amostras segundo a marca das bebidas.....	25
<b>Figura 11</b> – Distribuição percentual das amostras segundo o aroma das bebidas.....	26
<b>Figura 12</b> – Distribuição percentual das amostras segundo o gás das bebidas.....	26
<b>Figura 13</b> – Distribuição percentual das amostras segundo o corante das bebidas.....	27
<b>Figura 14</b> – Distribuição percentual das amostras segundo o edulcorante das bebidas.....	27
<b>Figura 15</b> – Distribuição percentual das amostras segundo o regulador de acidez das bebidas.....	28
<b>Figura 16</b> – Distribuição percentual das amostras segundo o conservante das bebidas.....	28
<b>Figura 17</b> – Distribuição percentual das amostras segundo o estabilizante das bebidas.....	29
<b>Figura 18</b> – Distribuição percentual das amostras segundo as vitaminas das bebidas.....	29
<b>Figura 19</b> – Distribuição percentual das amostras segundo o teor de sumo das bebidas.....	30
<b>Figura 20</b> – Distribuição percentual das amostras segundo o teor de álcool das bebidas.....	30

<b>Figura 21</b> – Distribuição percentual das amostras segundo o anti-oxidante das bebidas.....	31
<b>Figura 22</b> – Distribuição percentual das amostras segundo a cor das bebidas.....	31
<b>Figura 23</b> – Caixa de bigodes dos valores de LogCA, relativa à marca comercial das bebidas refrigerantes.....	40
<b>Figura 24</b> - Caixa de bigodes dos valores de CA, relativa aos aromas das bebidas refrigerantes.....	41
<b>Figura 25</b> - Caixa de bigodes dos valores de CA, relativa à presença de gás nas bebidas refrigerantes.....	42
<b>Figura 26</b> - Caixa de bigodes dos valores de LogCA, relativa aos corantes para as bebidas refrigerantes.....	44
<b>Figura 27</b> - Caixa de bigodes dos valores de LogCA, relativa aos edulcorantes para as bebidas refrigerantes.....	45
<b>Figura 28</b> - Caixa de bigodes dos valores de LogCA, relativa aos reguladores de acidez para as bebidas refrigerantes.....	46
<b>Figura 29</b> - Caixa de bigodes para os valores de LogCA, relativa aos conservantes para as bebidas refrigerantes.....	47
<b>Figura 30</b> - Caixa de bigodes para os valores de LogCA, relativa aos estabilizantes para as bebidas refrigerantes.....	49
<b>Figura 31</b> - Caixa de bigodes dos valores de CA, relativa às vitaminas para as bebidas refrigerantes.....	50
<b>Figura 32</b> - Caixa de bigodes dos valores de CA, relativa ao teor de sumo para as bebidas refrigerantes.....	51
<b>Figura 33</b> - Caixa de bigodes dos valores de CA, relativa à cor para as bebidas refrigerantes.....	52
<b>Figura 34</b> - Caixa de bigodes para os valores de LogCA, relativa ao efeito do método para o padrão de AA, para as bebidas refrigerantes.....	54
<b>Figura 35</b> - Caixa de bigodes para os valores de LogCA, relativa ao efeito do método para o padrão de AG, para as bebidas refrigerantes.....	55
<b>Figura 36</b> - Caixa de bigodes para os valores de LogCA, relativa ao efeito do método para o padrão de Trolox, para as bebidas refrigerantes.....	56
<b>Figura 37</b> - Caixa de bigodes para os valores de LogCA, relativa ao efeito do padrão para o método TRAP, para as bebidas refrigerantes.....	57
<b>Figura 38</b> - Caixa de bigodes para os valores de LogCA, relativa ao efeito do padrão para o método TEAC, para as bebidas refrigerantes.....	58
<b>Figura 39</b> - Caixa de bigodes para os valores de LogCA, relativa ao efeito do padrão para o método FRAP, para as bebidas refrigerantes.....	59

<b>Figura 40</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos à denominação para os vinhos. ....	61
<b>Figura 41</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos à presença de gás para os vinhos. ....	62
<b>Figura 42</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos ao teor de álcool, para os vinhos. ....	63
<b>Figura 43</b> – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos efeito do método, para os vinhos. ....	64
<b>Figura 44</b> – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos efeito do padrão, para os vinhos. ....	65
<b>Figura 45</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos à marca comercial, para as águas. ....	66
<b>Figura 46</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos aos aromas de morango e limão, para as águas ....	68
<b>Figura 47</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos aos edulcorantes, para as águas. ....	69
<b>Figura 48</b> - Caixa de bigodes para os valores de CA relativos aos conservantes, para as águas. ....	70
<b>Figura 49</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos às vitaminas, para as águas. ....	71
<b>Figura 50</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos aos antioxidantes, para as águas. ....	72
<b>Figura 51</b> – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos ao método, para as águas. ....	73
<b>Figura 52</b> – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos ao padrão, para o método TRAP, para as águas. ....	74
<b>Figura 53</b> – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos ao padrão, para o método TEAC, para as águas. ....	75
<b>Figura 54</b> – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos ao padrão, para o método FRAP, para as águas. ....	76
<b>Figura 55</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos à marca comercial, para as cervejas. ....	77
<b>Figura 56</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos à denominação, para as cervejas. ....	78
<b>Figura 57</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos aos corantes, para as cervejas. ....	79

<b>Figura 58</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos ao teor de álcool, para as cervejas. ....	81
<b>Figura 59</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos à cor, para as cervejas. ....	82
<b>Figura 60</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA, relativa ao efeito do método para o padrão de AA, para as cervejas. ....	83
<b>Figura 61</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA, relativa ao efeito do método para o padrão de AG, para as cervejas. ....	84
<b>Figura 62</b> – Caixa de bigodes para os valores de CA, relativa ao efeito do método para o padrão de Trolox, para as cervejas. ....	85
<b>Figura 63</b> – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos ao padrão, para o método TRAP, para as cervejas. ....	86
<b>Figura 64</b> – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos ao padrão, para o método TEAC, para as cervejas. ....	87
<b>Figura 65</b> – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos ao padrão, para o método FRAP, para as cervejas. ....	88

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Doenças relacionadas ao <i>stress</i> oxidativo [4].	2
<b>Tabela 2</b> - Alguns exemplos de várias espécies reactivas.	3
<b>Tabela 3</b> - Reagentes utilizados em cada método e sua marca comercial.	21
<b>Tabela 4</b> – Valores da capacidade anti-oxidante para as amostras de refrigerante para os vários métodos e padrões.	33
<b>Tabela 5</b> – Valores da capacidade anti-oxidante para as amostras de vinho para os vários métodos e padrões.	34
<b>Tabela 6</b> – Valores da capacidade anti-oxidante para as amostras de água para os vários métodos e padrões.	36
<b>Tabela 7</b> – Valores da capacidade anti-oxidante para as amostras de cerveja para os vários métodos e padrões.	37

## Lista de abreviaturas

### **Abreviatura   Nome completo**

AA	Ácido Ascórbico
AAPH	2,2'-azobis (2-metilpropanoamidina)
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazonlina-6ácido sulfónico)
AG	Ácido Gálico
AO	Antioxidante
AOs	Antioxidantes
CA	Capacidade Antioxidante
ERs	Espécies Reactivas
ERC	Espécie Reactiva de Carbono
ERCI	Espécie reactiva de Cloro
ERN	Espécie Reactiva de Nitrogénio
ERO	Espécie Reactiva de Oxigénio
ERS	Espécie reactiva de derivados de Enxofre
FRAP	<i>Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter</i> , do inglês
Gp <sub>x</sub>	Glutathione Peroxidase
H	Hidrogénio
LogCA	Logaritmo da Capacidade Antioxidante
M <sup>n+</sup>	Metais transição
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, forma oxidada
ND	Não Detectável
SenCA	Seno da Capacidade Antioxidante
SOD	SuperÓxido Dismutase
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> , do inglês
TPTZ	2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-1-ácido carboxílico
TRAP	<i>Total Radical trapping Antioxidant Parameter</i> , do inglês
UV-VIS	UltraVioleta-Visível

## 1 Introdução

As bebidas como vinho, sumos naturais, chá e cerveja, contêm polifenóis e outros constituintes naturais, provenientes de bagos de uva, citrinos, plantas e frutas. Estes constituintes trazem grandes benefícios para a saúde Humana devido às suas propriedades AOs. A ingestão destas bebidas ajudam por isso o organismo na luta contra os perigosos radicais livres, que causam o dano oxidativo celular, aumentando o risco de doenças cardíacas e cancro [1].

Alguns estudos demonstram que, pessoas que habitualmente consomem estas bebidas apresentam menor risco de contraírem doenças e apresentam também um retardamento no envelhecimento. Na Índia são produzidas várias bebidas medicinais que apresentam muitas propriedades antioxidantes e que são utilizadas como tónicos e reforços do sistema imunitário, pois trazem benefícios especialmente para o fígado e para o sistema cardio-vascular. Os chineses consomem de acordo com a sua dieta sopas e bebidas feitas a partir de frutas e vegetais que possuem muitas substâncias AOs.

São muitos os AOs provenientes de plantas e frutos. Estes compostos apresentam um potencial de inibição de radicais típico, passível de ser quantificados experimentalmente quando o composto é isolado da matriz de origem. Mas, independentemente deste potencial AO, a ingestão destes compostos é especialmente benéfica quando o organismo se encontra em *stress* oxidativo [1].

### 1.1 Stress Oxidativo

Por uma questão de sobrevivência muitos microorganismos, tiveram de se adaptar às novas condições atmosféricas que constantemente se alteravam devido ao crescente aumento de organismos com capacidade fotossintética e consequente aumento de oxigénio na atmosfera terrestre. Muitos defenderam-se dos elevados níveis de oxigénio restringindo-se a habitar locais onde este não existia. Outros, evoluíram e desenvolveram um sistema de defesa antioxidante capaz de combater a toxicidade do O<sub>2</sub> [2].

Os organismos aeróbios surgiram também desta evolução e utilizavam a respiração como forma de obter energia. Estes produzem e degradam espécies reactivas de oxigénio tanto em quantidades fisiológicas nas funções celulares normais como em elevadas quantidades que, ao superarem as defesas AOs naturais, dão origem a um estado conhecido como *stress* oxidativo.

O *stress* oxidativo pode resultar de dois factores principais: da diminuição dos AOs ou da produção elevada de espécies reactivas (ERs) de oxigénio e de azoto [3].

Há fortes evidências que o *stress* oxidativo tem acção sobre o processo de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências directas em muitos



processos patológicos, entre eles, a indução do cancro e a propagação da sida em pacientes seropositivos, bem como na fisiopatologia de muitas doenças crónicas, entre elas, doenças auto-imunes, doenças do pulmão, doenças cardíacas, intoxicação por xenobióticos e muitas outras como se pode ver na Tabela 1 [4].

Tabela 1 - Doenças relacionadas ao *stress* oxidativo [4].

Doença	Natureza do envolvimento com ER
Aterosclerose, Síndrome de Bloom, Síndrome de Down, Kwa-shiorkor, Doença de Keshan	Falha ou consumo excessivo de defesas antioxidantes.
Doença de Parkinson, estados tóxicos causados por álcool, fumo, CCl <sub>4</sub> , etc.	Uso de drogas e toxinas. Na doença de Parkinson as toxinas produzidas estariam envolvidas com a produção de radicais livres.
Doença de Alzheimer, Asma, Artrite reumatóide, asbestose, Síndrome de Insuficiência Respiratória do Adulto	Produção de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e HClO por células fagocíticas ativadas.
Esclerose múltipla	Perturbação estrutural da célula. As hemácias tornam-se mais susceptíveis à ação dos radicais livres.
Doença granulomatosa crónica	Defeito genético no sistema antioxidante.
Diabetes mellitus, anoxia, injúria da reperfusão, pré-eclâmpsia	Oxidação anormal de substratos ou mudanças na concentração de oxigénio.
Hipertensão arterial sistêmica	Produção de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por NADPH/NADP oxidase.
Hemocromatose idiopática, talassemia, anemia falciforme, doença de Wilson	Transferência de elétrons ao oxigénio por metais de transição.
Doença granulomatosa crónica, Deficiência de enzimas antioxidantes (Acatalsemia, por ex.)	Defeito genético no sistema antioxidante, especificamente o sistema NADPH oxidase.

O processo de oxidação que ocorre no corpo humano, devido a processos metabólicos, não é a única fonte de radicais livres. Há factores externos que podem igualmente contribuir para a formação de um excesso de radicais e geralmente podem causar danos irreparáveis. As causas externas mais prováveis de formação de radicais livres são: a poluição ambiental, os gases de escape de veículos, os raios X, a radiação ultravioleta do sol, o fumo de cigarro, o álcool, os resíduos de pesticidas, as substâncias tóxicas presentes em alimentos e bebidas, como os aditivos químicos e hormonas, o *stress* e o elevado consumo de gorduras saturadas, presentes em alimentos fritos e em enchidos.

### 1.1.1 Espécies reactivas de oxigénio

Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reactivos, que contêm número ímpar de electrões na última camada electrónica. Formam-se quando uma ligação covalente é partida, de modo que, cada porção conserva um dos electrões partilhados, ou podem ser formados quando um átomo ou molécula recebe só um electrão transferido durante uma reacção de oxidação-redução. O desemparelhamento de electrões na última camada confere alta reactividade a esses átomos ou moléculas. Existem várias espécies reactivas de acordo com as espécies radicalares, Espécies Reactivas de Oxigénio (ERO), Espécies Reactivas de derivados de Enxofre (ERS),

Espécies Reactivas de Cloro (ERCI), Espécies Reactivas de Nitrogénio (ERN) e espécies reactivas de Metais de transição ( $M^{n+}$ ), como se pode ver na Tabela 2.

Tabela 2 - Alguns exemplos de várias espécies reactivas.

Espécies reactivas	Exemplos
<b>ERO</b>	Anião super-óxido $O_2^{\cdot-}$
	Peróxido de hidrogénio $H_2O_2$
	Radical hidróxilo $HO^{\cdot}$
	Ozono $O_3$
	Singleto de oxigénio $^1O_2^*$
	Radicais peróxilo $ROO^*$
<b>ERN</b>	Radicais peroxinitrilo $ONOO^*$
	Dióxido de nitrogénio $NO_2^*$
	Monóxido de nitrogénio $NO^*$
<b>ERCI</b>	Cloraminas
	Peroxinitrito $ONOO^*$
	Ácido hipocloroso $HOCl$
<b>ERS</b>	Radical tiíla $RS^*$
<b>Metais transição</b>	Ferro Fe
	Cobre Cu
	Manganês Mn

A Figura 1 mostra as várias fontes de ER, endógenas e exógenas, e as defesas AOs presentes no nosso organismo. Os oxidantes ou espécies radicalares são gerados em vários componentes celulares. Quando as defesas AO são eficientes e suficientes mantêm-se a homeostase fisiológica e assim o funcionamento normal do organismo. Mas se as defesas não são eficientes, ou a produção de ER pelo organismo está descontrolada, ocorre o stress oxidativo, que pode causar o dano celular dos organismos e proporcionar o envelhecimento ou o aparecimento de doenças.

Por outro lado, os radicais livres são muito úteis. O organismo humano não vive sem eles, pois são indispensáveis na defesa contra infecções. Quando algo estranho consegue entrar no organismo, como um vírus, uma bactéria ou uma partícula de pó, “soa um alarme” químico para as células do sistema imunológico. Os primeiros a chegar ao local são os neutrófilos que vão agir contra o invasor, seguindo-se os macrófagos que engolem e trituram o agente estranho. Essa estratégia de defesa só é possível porque o organismo utiliza o potencial destruidor dos radicais livres. O macrófago, por exemplo, envolve uma bactéria para bombardeá-la com superóxidos.

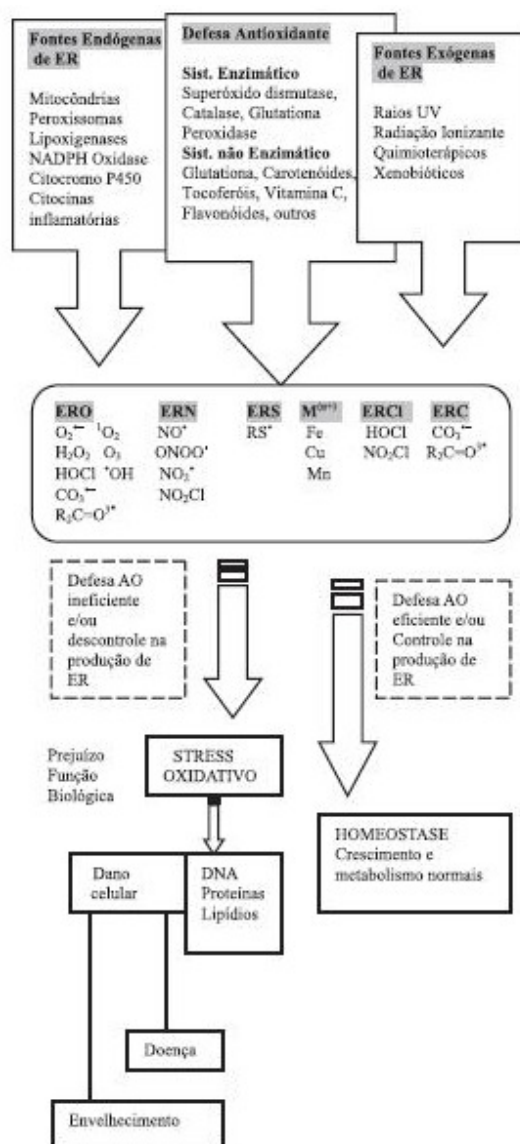


Figura 1 - Fontes e respostas celulares às espécies reativas [4].

### 1.1.2 Defesas antioxidantes

Os antioxidantes podem ser moléculas com cargas positivas que se combinam com os radicais livres, de carga negativa, de modo a complexar essas espécies reativas, tornando-os inofensivos. Estas substâncias têm a capacidade de anular a ação desses radicais, daí o nome AOs. O efeito prejudicial dos radicais livres ocorre quando eles estão em quantidades excessivas no organismo, ultrapassando a capacidade deste para os neutralizar com os seus sistemas naturais. Os sistemas antioxidantes podem ser divididos em dois tipos: enzimáticos e não enzimáticos.

Os enzimáticos são tipicamente endógenos e os não enzimáticos podem provir da alimentação humana.

Relativamente aos antioxidantes enzimáticos, a primeira enzima específica para a remoção catalítica de um radical de oxigénio a ser descoberta foi a superóxido dismutase (SOD). A SOD tem um papel fundamental na defesa do organismo contra as ERO, pois esta enzima é capaz de metabolizar o anião superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio. Juntamente com outras duas, a catalase e a glutathione peroxidase, são as principais defesas antioxidantes que actuam nos organismos superiores.

A enzima glutathione peroxidase (GPx) apresenta uma elevada afinidade para o peróxido de hidrogénio, sendo capaz de remover quantidades muito pequenas desta molécula. Esta enzima pode ser encontrada em algumas algas e fungos. As células animais contêm dois tipos de glutathione peroxidase, sendo que um deles é selênio. A GPx encontra actividade alta no fígado, actividade moderada no coração, pulmões e cérebro, e actividade baixa nos músculos.

A enzima catalase está presente na maioria das células aeróbicas, sendo que em animais se encontra principalmente no fígado, rins e eritrócitos. Os nutrientes mais importantes coadjuvantes da catalase são o ferro e a vitamina E, que se encontram distribuídos na membrana celular. A catalase evita a acumulação de metahemoglobina e decompõe o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio [3].

No que diz respeito aos AOs não enzimáticos, alguns nutrientes essenciais podem atacar directamente os radicais de oxigénio. A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), ver Figura 2, é o maior AO lipossolúvel presente em todas as membranas celulares e, portanto, actua na protecção contra a lipoperoxidação. Esta vitamina pode reagir directamente com uma variedade de oxiradicais, como o anião superóxido e o singlete de oxigénio. Primeiro o  $\alpha$ -tocoferol inactivo reage com o singlete de oxigénio e protege a membrana contra essa espécie. Durante a acção antioxidante, destruindo a cadeia de lipoperoxidação, nas membranas, o  $\alpha$ -tocoferol é consumido e convertido na forma de radical. A vitamina E pode também proteger contra a peroxidação modificando a estrutura da membrana [5].

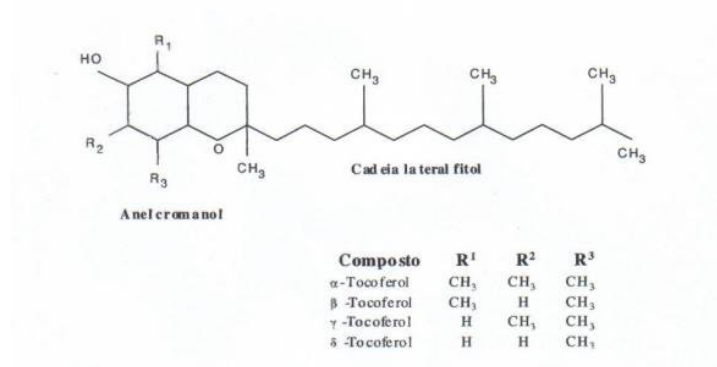


Figura 2 – Estrutura da vitamina E, ou tocoferol, com os vários grupos R.[6].

Os carotenóides, principalmente o  $\beta$ -caroteno, funcionam como precursores da vitamina A. São absorvidos pelos intestinos e actuam também como AOs. Têm assim um papel duplo: diminuem a formação do singleto de oxigénio e ajudam a remover aqueles já formados. A vitamina A tem pouca acção antioxidante e é incapaz de agir sobre o singleto de oxigénio, mas o seu precursor, o  $\beta$ -caroteno, é o ligante mais eficiente desta forma reactiva de oxigénio encontrada na natureza. O  $\beta$ -caroteno é um pigmento presente em todas as plantas e pode ser encontrado nas membranas celulares [5].

A vitamina C (ácido ascórbico), é hidrossolúvel e também age contra os radicais livres e o singleto de oxigénio. O AA participa ainda da regeneração da forma reduzida e antioxidante da vitamina E.

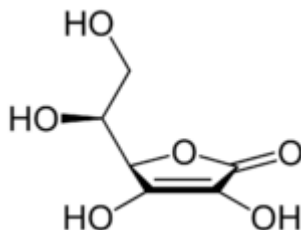


Figura 3 – Estrutura da vitamina C ou ácido ascórbico [7].

O AA puro é sólido, branco, cristalino e muito solúvel em água. As plantas e animais facilmente o sintetizam, mas os humanos e os primatas, obtêm-no a partir dos alimentos que consomem. O AA é necessário *in vivo* como cofactor de várias enzimas, sendo as mais conhecidas a prolina-hidroxilase e a lisina-hidroxilase, envolvidas na biossíntese do colágeno. A deficiência do ascorbato na dieta humana causa o escorbuto. A mais impressionante propriedade química do ascorbato é a sua habilidade para agir como agente redutor [5].

Existem ainda outros antioxidantes não enzimáticos que participam da defesa contra as espécies reactivas nos sistemas biológicos como, por exemplo, a ceruloplasmina, o ácido úrico, a taurina, os flavonóides e outros compostos fenólicos de origem vegetal. Os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático e um ou mais grupos hidroxilos. São classificados como fenóis simples e ácidos fenólicos, derivados de flavonóides, os quais se encontram em grandes quantidades em vegetais e frutas e são considerados como uma excelente fonte de antioxidantes naturais. Os flavonóides são o grupo mais importante no grupo dos fenólicos e são divididos em 3 compostos principais: as catequinas, presentes em frutas e folhas de chá, as flavonas e as isoflavonas e flavanóis e o seus glicosídios, como a quercetina, a mircetina, a rutina e o xantohumol, presentes em vegetais e cervejas. Os compostos fenólicos são capazes de eliminar o anião superóxido e o singlete de oxigénio pela formação de espécies de menor reactividade ou por doar electrões [2]. Além destes, há vários nutrientes essenciais de origem mineral, que participam no processo AO em associação com enzimas. São eles, zinco, cobre, manganês, selênio e ferro.

Podendo os AOs não enzimáticos surgir no organismo por via dos alimentos, é importante o ser humano apresentar uma alimentação cuidada e equilibrada no que diz respeito a este tipo de nutrientes. Esta questão pode ser avaliada recorrendo a métodos capazes de quantificar a CA global de uma amostra alimentar, i.e., medir a capacidade daquela amostra apresentar propriedades AOs, ignorando o tipo e quantidade de AOs presentes.

## 1.2 Quantificação da CA

Os diversos métodos propostos pela literatura variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para a sua detecção e quantificação. Em todos os ensaios são gerados radicais que, por sua vez, reagem com moléculas alvo, para produzir uma mudança mensurável; a presença de AO altera esse sinal e permite a sua análise quantitativa.

Para avaliar a CA existem vários métodos ópticos convencionais. Neste trabalho foram estudados os seguintes métodos: TRAP, TEAC e FRAP. O método TRAP é um método cuja determinação analítica envolve reacções de transferência de átomos de H, enquanto que o TEAC e o FRAP envolvem reacções de transferência de electrões.

### 1.2.1 FRAP, Ferric Ion Reducing Antioxidant Parameter

Este método testa a força antioxidante do substrato, pela avaliação da redução do complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ (ferritripiridiltriazina) a  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ (ferroso-tripiridiltriazina) por agentes redutores. O princípio deste método baseia-se na capacidade da amostra de reduzir o ferro (III) a ferro (II). O complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ tem uma cor violeta intensa e pode ser monitorizado a 593 nm por espectrofotometria na região do visível. Se o substrato não tiver CA não se forma o complexo e a solução mantém a cor da solução FRAP, amarelo palha. As limitações do método derivam de nem todos os redutores que reduzem o ferro (III) a ferro (II) serem agentes antioxidantes e nem todos os agentes antioxidantes terem a capacidade específica de reduzir o ferro (III) a ferro (II). O resultado final pode ser comparado relativamente [4]

O método FRAP é um método claro e acessível, a preparação dos reagentes é de fácil execução e os resultados são reprodutíveis [8].

### 1.2.2 TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

O princípio do método TEAC consiste na monitorização do radical  $\text{ABTS}^{+\bullet}$ , produzido pela oxidação do ABTS, Figura 4, na sequência da adição de uma amostra contendo um agente AO [2]. Este radical pode ser facilmente determinado por espectrofotometria e apresenta a sua absorvância característica máxima aos 415 nm [4]. A adição do radical a um meio contendo AOs, permite avaliar, através do grau de descoloração, a CA do mesmo. Este método é bastante simples e por isso muito utilizado para medir a CA de várias substâncias. A sua principal limitação é o facto do valor TEAC caracterizar a capacidade da amostra reagir com o ABTS, mais do que a sua capacidade de inibir o processo oxidativo [2]. Outra limitação é a pequena selectividade do ABTS na reacção com dadores de H.

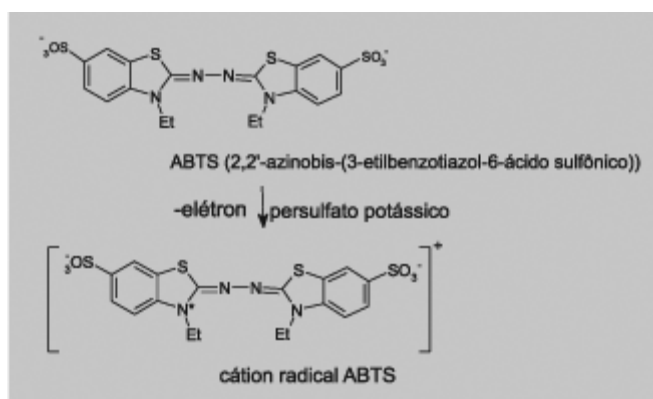


Figura 4 - Reacção de formação do catião ABTS [9].

### 1.2.3 TRAP, Total Radical Trapping Antioxidant Parameter

Este método baseia-se na geração de radicais peróxido,  $RO_2^{\cdot}$ , por decomposição térmica a uma velocidade controlada de azoiniciadores, por exemplo o AAPH, 2,2'-azobis (2-metilpropanoamidina). Após a adição do AAPH, forma-se o cátion  $ABTS^{+*}$ . Este radical confere uma coloração azul intensa à solução que na presença de um agente antioxidante se torna incolor. A presença deste pode ser detectada por espectrofotometria a 734 nm. O método TRAP permite estimar o potencial total de antioxidantes reativos presentes na amostra.

## 1.3 Bebidas

Como foi referido anteriormente, existem muitas bebidas que contêm muitos agentes antioxidantes, que nos ajudam no combate contra os radicais livres e consequentemente nos trazem muitos benefícios na luta contra várias doenças e contra o envelhecimento.

O aumento da ingestão destas bebidas e a sua crescente procura no mercado tem revolucionado a indústria das bebidas em todo o Mundo. As bebidas seleccionadas para integrar este trabalho foram as águas, as cervejas, os refrigerantes e os vinhos, pois apresentam substâncias de origem natural ou adicionadas que podem aumentar a CA das mesmas.

### 1.3.1 Águas

Para viverem, todos os seres vivos precisam de água e o Ser Humano não é excepção, pois grande parte da massa do corpo humano é constituída por água. Para além de ter um papel estruturante, a água intervém em numerosos metabolismos, como a digestão e a depuração renal. Favorece igualmente a evolução celular e assegura o bom equilíbrio iónico do organismo. Todos os dias, o corpo humano precisa de renovar as suas reservas de água, sendo necessários cerca de 2 litros para compensar as perdas do dia-a-dia. Caso não renovemos a água do nosso corpo, desencadeia-se o processo conhecido por desidratação que, em casos extremos, pode conduzir à morte. A água é desta forma fundamental à vida e é o elemento que melhor caracteriza a essência do Ser Humano.

A mineralização da água mineral natural e de nascente decorre da sua permanência na área abaixo do solo e depende do tempo que estas permanecem nos aquíferos em contacto com a rocha. O seu percurso até esta etapa é explicado pelo chamado Ciclo da Água, que tem início nos oceanos [10]



Nos aquíferos onde existem águas minerais naturais e de nascente, o tempo de permanência da água em contacto com a rocha pode ser da ordem das dezenas, centenas ou milhares de anos, daí que possam adquirir maiores e diferentes mineralizações comparativamente às águas subterrâneas. Toda a água que consumimos apresenta sempre sais minerais.

As águas minerais naturais e as águas de nascente são ricas em sais minerais, os quais são benéficos para a saúde e desencadeiam reacções naturais essenciais ao funcionamento do organismo. Estes sais minerais são constituídos por associações de diversos elementos químicos que fazem parte da constituição da crosta terrestre. Ao entrarem em contacto com a água, os minerais começam a dissolver-se e a quantidade destes nas águas depende, em muito, do tempo e das formações geológicas com as quais estiveram em contacto. O cálcio, o fósforo, o magnésio, o potássio, o sódio, o ferro, o fluoreto e a sílica são os sais minerais com maior presença nas águas naturais [10].

As águas disponíveis para consumo do Homem não são todas iguais, podendo ser agrupadas em três tipos diferentes:

- Águas Minerais Naturais;
- Águas de Nascente;
- Outros tipos de água consumíveis.

As águas minerais naturais encontram-se no subsolo a grandes profundidades. São sistemas de água sem elementos de poluição e a sua composição química é totalmente natural, sendo provocada pela interacção água/rocha, possuindo oligo-elementos benéficos à vida humana. Têm por isso uma composição química específica, mantendo as suas características ao longo do tempo.

Mas as águas minerais naturais não são todas iguais. Para além de possuírem características químicas e paladares distintos, algumas águas minerais naturais possuem gás natural. São as chamadas águas gasocarbónicas. Para preservar todas as suas qualidades e pureza, o engarrafamento das águas minerais naturais só pode ser efectuado no local da captação. A diferença das águas de nascente em relação às águas minerais naturais é precisamente o tempo de circulação no subsolo, o qual é mais curto. Decorrente do curto período de circulação subterrânea, a presença de sais minerais nas águas de nascente não é constante ao longo do ano. São águas bacteriologicamente sãs e com características originais. Apesar da sua elevada importância, nem todas as águas possuem garantidamente características naturais e saudáveis. Apenas as águas minerais naturais e as de nascente mantêm a sua pureza original, pelo que a escolha destas águas é a melhor maneira de ajudar a manter o equilíbrio do corpo [10].

A água mineral natural e a água de nascente são as únicas águas globalmente naturais que não podem sofrer quaisquer tratamentos e que são comercializadas sem adição de químicos ou aditivos [11].

#### 1.3.1.1 Águas aromatizadas

As águas aromatizadas surgem no mercado em resposta às necessidades actuais dos consumidores. Segundo a Portaria 703/96, uma água aromatizada é um refrigerante aromatizado, pois resulta da diluição de substâncias aromatizantes, mas não contém açúcares nem edulcorantes [12].

Segundo a Portaria n.º 620/90 de 3 de Agosto, uma substância aromatizante, é uma substância química definida que apresente propriedades aromatizantes e que, consoante o modo de obtenção, corresponde a uma das seguintes categorias: substância aromatizante naturais, idêntica à natural ou artificial [13].

Os principais aditivos adicionados a estas águas são, aromatizantes, reguladores de acidez, acidificantes, conservantes, vitaminas, e AOs. Apesar de não contemplado na legislação, neste estudo encontraram-se águas aromatizadas que continham edulcorantes.

O Dec-Lei N.º 363/98 de 19 de Novembro não prevê a inclusão dos aromatizantes na lista de aditivos devido às propriedades destas substâncias, pois estas são bastante mais complexas face aos outros aditivos. Por esta razão adoptaram-se disposições específicas relativamente a estes aditivos. A portaria 620/90 de 3 de Agosto estabelece os princípios gerais, definições e condições de obtenção dos aromas.

#### 1.3.2 Cervejas

É dos Sumérios que nos chega, 7000 anos antes de Cristo, o mais antigo conhecimento de uma bebida fermentada feita à base de cereais - o antepassado da cerveja dos nossos dias. Naturalmente que a cerveja terá tido, ao longo dos anos, diferentes caracterizações, tendo como traço comum o facto de ser uma bebida fermentada, obtida a partir de cereais. Em Portugal, desde o século XVII que há notícia de se consumir cerveja [10].

### 1.3.2.1 Processo de Fabrico

A primeira fase no processo de produção de uma cerveja é a *fabricação do mosto*. Esta fase compreende as seguintes etapas:

- *Moagem* - extracção e conversão dos componentes do malte.
- *Brassagem* - a farinha proveniente dos cereais (malte e outros cereais não maltados), Figura 5, é submetida, após mistura com água, a condições operatórias em que as variáveis tempo, temperatura e pH são utilizadas de forma a obter-se um mosto de composição adequada ao tipo de cerveja a produzir.
- *Filtração do mosto* - após a brassagem, todo o volume é sujeito a uma filtração para separar a parte insolúvel (drêche, que é um excelente alimento para o gado) do filtrado (mosto).
- *Ebulição do mosto* - o mosto, diluído e filtrado, é levado à ebulição durante cerca de 2 horas. É nesta fase que é adicionado o lúpulo.
- *Fermentação* - é a operação durante a qual os açúcares do mosto pela acção da levedura se transformam em álcool e dióxido de carbono.
- *Maturação* - é a fase subsequente à da fermentação e corresponde ao período de estacionamento da cerveja a temperaturas adequadas com o fim de permitir a libertação dos componentes voláteis indesejáveis.
- *Estabilização* - é a operação seguinte. Consiste em deixar estabilizar a cerveja, a temperaturas entre os 0 °C e os 2 °C, de forma a permitir que esta se equilibre coloidalmente.
- *Clarificação* - é a operação que dá à cerveja a sua limpidez, eliminando os últimos elementos de turvação ainda em suspensão [10].

### 1.3.2.2 Principais características

A cerveja apresenta várias características típicas de ser um extracto de cereais sujeito a um processo de fabrico bem conhecido. Porém, a variação de matérias-primas e de algumas etapas da sua produção, conduz a produtos finais de características organolépticas e de composição química muito distintas. Por exemplo, o mosto a fermentar tem uma concentração em açúcares específica, que é característica dos vários tipos de cerveja e que define o seu extracto primitivo; o teor alcoólico das cervejas está relacionado com o tipo de mosto que vai ser fermentado, com as temperaturas escolhidas para a fermentação e com as leveduras seleccionadas.

A quantidade de lúpulo, adicionado ao mosto origina um teor de amargor nas cervejas proporcional à adição efectuada; a cor da cerveja está essencialmente relacionada com a coloração dos maltes utilizados na sua fabricação [10].



Figura 5 – Principais matérias primas da cerveja, lúpulo e cereais maltados. [9].

O dióxido de carbono que está presente nas cervejas, é um composto que provém directamente da acção fermentativa das leveduras; os açúcares fermentescíveis são, de um modo genérico, desdobrados em álcool e em dióxido de carbono. Este fica retido no líquido e liberta-se tanto mais facilmente quanto maior for a temperatura do meio. Uma das características mais importantes da cerveja é a sua capacidade de formar espuma abundante, cremosa, estável e aderente ao copo.

Normalmente, as cervejas são ricas em aromas e gostos diversos, provenientes de compostos voláteis cuja composição e concentração dependem das matérias-primas, do processo de fabricação utilizado e da estirpe de levedura escolhida. A cerveja é uma bebida que evolui no tempo, provocando uma diminuição do seu brilho e, por fim, o aparecimento de uma turvação acompanhada pela deterioração do aroma e paladar. A turvação e a degradação do aroma e paladar são acelerados com a exposição a temperaturas altas, provocando a oxidação da cerveja. A cerveja sofre alterações de aroma e gosto, quando exposta à luz solar e também à luz fluorescente, pois a luz activa a degradação de substâncias, resultando produtos aromáticos desagradáveis. Como tal, a cerveja deve ser armazenada em ambientes com temperaturas inferiores a 20°C e não seja exposta à luz solar, nem receba luz directa nas prateleiras [10].

### 1.3.2.3 Benefícios para a saúde

A cerveja, reduz, juntamente com outras bebidas alcoólicas (vinho por exemplo), o risco de doenças do coração e parece ter evidentes benefícios para a saúde, demonstrados por investigações actuais.

Para o Prof. alemão Hoffmeister, se os europeus deixassem de beber cerveja notar-se-ia um aumento das doenças cardiovasculares, uma diminuição na esperança de vida de cerca de 2 anos e um abaixamento geral na sensação de bem-estar [14]. Ainda segundo um estudo médico, publicado no British Medical Journal, três bebidas alcoólicas por dia (30 g de álcool) podem reduzir em 25% o risco de um ataque de coração [14].

Há, no entanto, situações em que beber bebidas alcoólicas representa um risco e pode ser apropriado não o fazer: durante a gravidez, antes de conduzir ou trabalhar com máquinas, antes de praticar desporto ou quando se está a seguir certo tipo de medicações [14].

O estilo de vida e a dieta praticada, entre outros factores, condicionam os resultados do estudo da influência do álcool sobre as doenças do coração. Contudo, foi já demonstrado que, o consumo moderado de álcool pode dar lugar a uma redução de 17% no risco de doença coronária. Trabalhos recentes sugerem que as vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>9</sub>, presentes na cerveja, podem significar uma protecção adicional para os seus consumidores moderados, face às doenças cardiovasculares. Isto porque estas vitaminas parecem ajudar a reduzir o nível de homocisteína no sangue e teores elevados desta, tal como acontece com o "mau colesterol" (LDL), estão associados a riscos elevados de doença. Estudos epidemiológicos, foram realizados, para o efeito, no País de Gales, República Checa e África do Sul [14].

O consumo frequente e moderado de álcool diminui o risco de formação de pedras nos rins e protege os ossos do risco de osteoporose. O consumo moderado de álcool é eficaz na redução do stress e tensão nervosa e aumenta a sensação de bem-estar. A cerveja pode fazer parte de uma dieta equilibrada, fornecendo vitaminas essenciais e sais minerais (é rica em potássio e de baixo teor em sódio, rica em magnésio e tem pouco cálcio), não contém quantidades significativas de colesterol e apresenta baixo teor de açúcares livres.

Os bebedores moderados de cerveja parecem estar protegidos da acção nefasta da bactéria *helicobacter pylori* no estômago. A cerveja é uma fonte de fibra solúvel, proveniente das células das paredes da cevada (1litro de cerveja contém, em média, 20% da dose diária recomendada, chegando, algumas, a cerca de 60%).

A cerveja contém, também, AOs naturais, de possível efeito benéfico na saúde. O seu teor varia com o tipo de cerveja e, logo, com as matérias primas e o processo de fabrico utilizados. Para a mesma dose de álcool, a cerveja contém mais de 2 vezes o teor de antioxidantes presentes no vinho branco mas apenas cerca de metade dos que contém o vinho tinto.

Contudo, muitos dos antioxidantes presentes no vinho tinto são moléculas de grande peso molecular, menos bem absorvidas pelo organismo humano que as pequenas moléculas que se encontram na cerveja.

Os flavonóides provenientes do lúpulo parecem trazer potenciais benefícios para a saúde, protegendo o organismo contra algumas doenças e podendo ajudar na luta contra certos tipos de cancro, como o demonstram estudos *in vitro*, que estão, agora, a ser complementados com investigações *in vivo* [14]

### 1.3.3 Refrigerantes

Tipicamente, o refrigerante é uma bebida rica em corantes e conservantes que contém grande quantidade de açúcar, excepto nas versões *light* e *diet* que apresentam menor quantidade. Possui aroma sintético de fruta e gás carbónico. O refrigerante surgiu em 1676 em Paris, numa empresa que misturou água, sumo de limão e açúcar. Em 1772, Joseph Priestley realizou experiências acrescentando gás a líquidos, mas a bebida só foi comercializada em 1830. Nessa época, os farmacêuticos tentavam associar ingredientes curativos às bebidas gaseificadas [15].

De acordo com a Portaria 703/96, entende-se por bebida refrigerante ou refrigerante, a bebida não alcoólica constituída por água contendo em solução, emulsão ou suspensão qualquer dos ingredientes referenciados na presente portaria no artigo n.º 2, ponto 2, podendo ser opcionalmente acidulada, adoçada, carbonatada e podendo conter fruta, sumo de fruta e/ou sais. Os seus aromas podem ter origem em sumos de frutos, em extractos vegetais ou substâncias aromáticas [12].

Para além da designação genérica de bebida refrigerante esta deve ser completada por qualquer uma das denominações reservadas e expressas na mesma portaria. Algumas dessas denominações reservadas, previstas na lei e abordadas neste trabalho são:

- refrigerantes de sumo de fruta, o refrigerante turvo ou límpido, resultante da diluição em água do sumo ou do polme de frutos, respectivos concentrados ou desidratados, com um teor de sumo compreendido entre os valores mínimos a seguir indicados (m/m) e a concentração mínima fixada para o néctar do mesmo fruto, podendo conter aromatizantes naturais ou idêntico aos naturais.

Ananás, morango, limão, toranja e frutos ácidos diversos – 6%;

Laranja - 8%;

Alperce e pêssego – 8%;

Maça, pêra e uva – 16%;

Outros frutos e mistura de frutos – 10%.

- Refrigerante aromatizado, o refrigerante resultante da diluição de aromatizantes em águas. No caso de não conter açúcares nem edulcorantes, designar-se-à por “água aromatizada” (desenvolvido no sub-capítulo das águas) [12].

As bebidas refrigerantes podem conter aromatizantes, corantes, edulcorantes, reguladores de acidez, acidificantes, conservantes, estabilizantes, vitaminas, AOs, anti-espumantes, sumo e gás carbónico.

O dec-lei n.º 363/98 estabelece as definições de cada aditivo alimentar e as suas condições de utilização dos aditivos alimentares, com excepção dos corantes e edulcorantes.

Um conservante é uma substância que prolonga a durabilidade dos géneros alimentícios protegendo-os contra a deterioração causada por microorganismos; um AO é também uma substância que prolonga a durabilidade dos géneros alimentícios mas que os protege da deterioração causada pela oxidação, tal como a rancidez das gorduras e as alterações de cor. Os reguladores de acidez por sua vez alteram ou controlam a acidez ou a alcalinidade dos alimentos. Acidificantes são substâncias que aumentam a acidez de um alimento e/ou lhes confere um sabor acre.

Os agentes anti-espuma, ou anti-espumantes, são substâncias que impedem ou reduzem a formação de espumas. As substâncias que tornam possível a manutenção do estado químico dos géneros alimentícios e dos quais fazem parte as substâncias que permitem uma dispersão homogénea de duas ou mais substâncias imiscíveis num alimento, bem como as substâncias que estabilizam, retêm ou intensificam a cor natural dos alimentos são os estabilizadores [16].

Quanto aos edulcorantes, a Directiva 94/35/CE é uma directiva específica relativa aos aditivos alimentares desta natureza. É aplicável aos aditivos alimentares utilizados para introduzir um sabor açucarado nos géneros alimentícios, incluindo os destinados a uma alimentação especial, ou como edulcorante de mesa. Não é aplicável aos géneros alimentícios que possuem um poder edulcorante como o mel. Os edulcorantes utilizam-se no fabrico de géneros alimentícios de valor energético reduzido, no fabrico de produtos dietéticos, bem como para prolongar a validade durante a exposição dos géneros alimentícios.



A utilização de edulcorantes em substituição do açúcar é justificada no que se refere ao fabrico de géneros alimentícios de valor energético reduzido, de alimentos não cariogénicos e de alimentos sem adição de açúcar para prolongar a validade durante a exposição.

#### 1.3.4 Vinhos

O cultivo da vinha é uma das mais antigas culturas do mundo. Os registos apontam para que tenha surgido há cerca de 4000 anos na parte oriental do Mar Negro no Transcaucaso, actual Arménia e Arzebeijão. No Egipto, na IV dinastia dos faraós (2500 a. c.) já se produzia vinho. Mais tarde, na Idade do Bronze a "Vitis Vinifera" era cultivada no Egipto e na Grécia e, posteriormente, na Idade do Ferro, o seu cultivo estendeu-se até à Itália e a outras regiões da Europa. Nesta altura já os Fenícios percorriam o mediterrâneo transportando nas suas naves o vinho produzido na Grécia, Itália e em Espanha.

Mais tarde os Gregos, que descobriram a Península Itálica por volta do século VII a.c. e nela criaram as suas próprias colónias, prosperaram nos impérios comerciais onde o principal protagonista era o comércio do vinho [18].

Posteriormente à grande expansão dos vinhedos, assiste-se, no decorrer da Idade Média, a um declínio da viticultura. Se por um lado nos países cristãos a cultura da vinha sobrevive às invasões - graças aos monges e aos abades, por outro, nos países mediterrâneos, a produção de vinho é abandonada fruto da tutela árabe. A viticultura mediterrânea torna-se pouco próspera e só voltará a assumir um papel preponderante entre o século XVII e o século XIX. O aparecimento de vinhos de qualidade remonta ao início do século XVII, com a produção de vinhos regionais.

O século XIX trouxe a proliferação de parasitas como o míldio, o oídio, o pirale e, principalmente, a filoxera, trazida da América, que atacava a raiz das videiras.

A partir do Século XIX ultrapassada a praga da filoxera regista-se o retomar da actividade vinícola, com um forte desenvolvimento nos anos 40. Nos anos 50, a área vitícola mundial ascende aos 8 milhões de hectares com uma produção de 200 milhões de hectolitros. Nos anos 60 atinge-se os 10 milhões de hectares com uma produção de 250 milhões de hectolitros. Na década de 70, apesar da área vitícola mundial ter estabilizado, o aperfeiçoamento das técnicas de cultura da vinha conduziu a um aumento da produção. Embora nesta altura a área de vinha não tenha aumentado nos países tradicionalmente vitícolas como França, Itália e Espanha, em locais como a América do Sul e os países anglo-saxónicos, o seu crescimento foi significativo [18].

Nos anos 90, a produção mundial atingiu os 260 milhões de hectolitros [10]. A Figura 6 apresenta os consumos anuais de vinho por habitante.



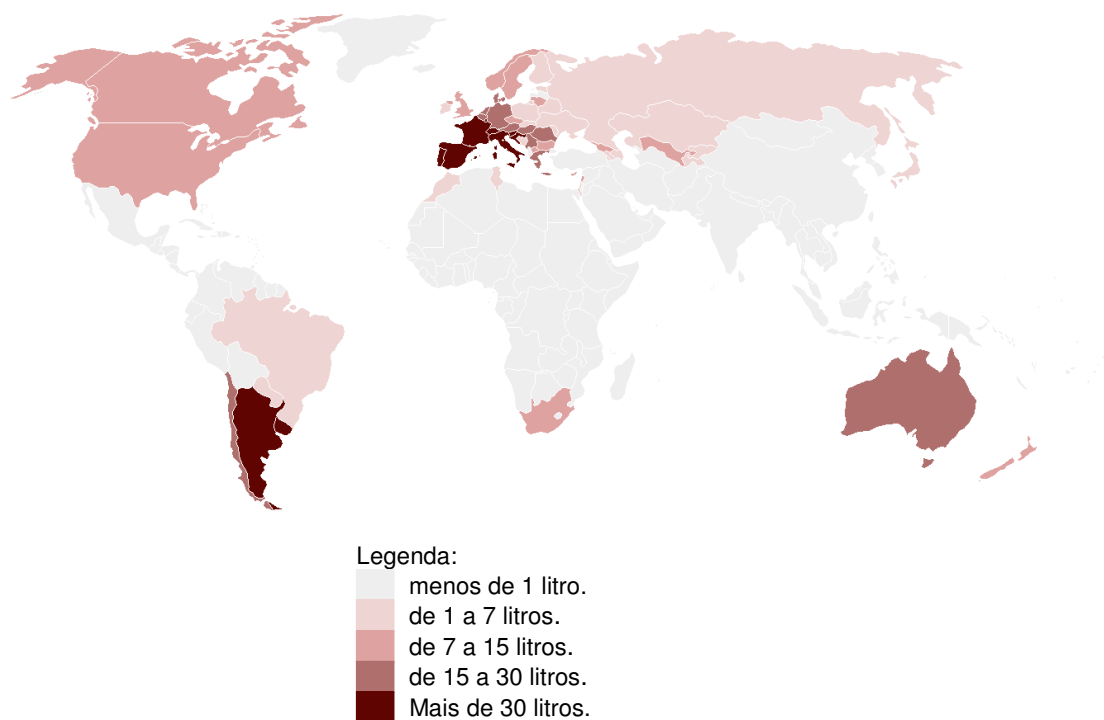


Figura 6 – Consumo anual de vinho por habitante [18].

#### 1.3.4.1 Benefícios para a saúde

O que torna o vinho um alimento e uma bebida tão especial, tão diferente de todas as outras, são os polifenóis. Mais especificamente, é a sua relação com os outros componentes do vinho, sobretudo com o álcool. É justamente essa afinidade a grande responsável pelo poder organoléptico e terapêutico desta bebida tida como o néctar dos deuses.

Os polifenóis existem no reino vegetal com a função de proteger as plantas. São eles que protegem os vegetais de ataques físicos, como o dos raios ultravioletas do sol e de ataques biológicos, como os dos fungos, dos vírus e das bactérias. Os polifenóis concentram-se nas folhas, cascas e sementes dos vegetais. São eficientes nesta função porque têm um efeito AO e antimicrobiano muito forte. Os cerca de 200 polifenóis já identificados no vinho provêm entre 90 e 95% das cascas e sementes das uvas. Durante a vinificação, os vinhos tintos são fermentados na presença das cascas e sementes, ao contrário dos brancos que, quando se inicia a fermentação, são separados desses elementos, Figura 7. Sendo o álcool um dos melhores solventes, extractores, dos polifenóis, os vinhos tintos são, por isso, mais ricos em polifenóis e, como regra, têm mais benefícios para a saúde.



Figura 7 – Vinho tinto e branco [18].

Os vinhos brancos embora tenham menos polifenóis também têm algum poder terapêutico. De uma maneira geral, são mais diuréticos, desintoxicantes e ricos em potássio, cálcio e magnésio. Os polifenóis no vinho branco são em menor quantidade, mas com uma grande CA. Pesquisas realizadas na Universidade de Búfalo, em Nova Iorque, mostraram que as pessoas que têm o hábito regular de beber vinho branco moderadamente, às refeições, têm uma melhor função pulmonar. É bem sabido que a função pulmonar tem relação directa com a qualidade e quantidade de vida [19].

#### 1.4 Objectivos do trabalho

O objectivo deste trabalho foi avaliar a CA de bebidas comerciais. Foram análises 50 amostras de diferentes bebidas. As bebidas analisadas foram águas, refrigerantes, vinhos e cervejas. A CA das bebidas foi analisada por três métodos distintos, TRAP, TEAC e FRAP. Os valores da CA das bebidas analisadas foram comparados com três antioxidantes de referência, AA, AG e Trolox. Posteriormente foi analisada a influência de cada constituinte da bebidas no valor de CA.

## 2 Descrição Experimental

### 2.1 Amostras

O presente estudo engloba 50 amostras de diversas bebidas, águas, cervejas, refrigerantes e vinhos. As amostras incluídas neste estudo constituem uma amostragem de cada um dos tipos considerados, todas adquiridas no comércio nacional. As bebidas estudadas são as seguintes:

#### Águas

- Luso natural, Luso limão, Luso manga, Luso morango, Luso kiwi, Luso cereais, Luso pêra e chá verde;
- Vitalis natural, Vitalis limão e magnésio, Vitalis maçã e chá branco, Vitalis ananás;
- Jana natural, Jana limão e Jana morango e goiaba.

#### Vinhos

- Cabaninha; Pavão; Taludes Altos; Porta da Ravessa; Convento da Vila e Terras D'El Rei.

#### Refrigerantes

- Jói maçã, Jói limão, Jói laranja, Jói ananás;
- Trina maçã, Trina limão, Trina laranja, Trina ananás;
- Frutis maçã, Frutis limão, Frutis laranja, Frutis ananás;
- Sumol laranja, Sumol ananás;
- Frisumo laranja, Frisumo ananás;
- Continente laranja e Continente ananás.

#### Cervejas

- Super Bock (Sabor Autêntico), Super Bock Stout;
- Sagres, Sagres preta;
- Leffe, Leffe Brune;
- Grimberger, Grimberger Optime brune;
- Imperial; Auchan; Jumbo e Tagus.

### 2.2 Equipamento e Material

Foi utilizado material corrente de laboratório para a preparação das várias soluções. Estas soluções foram preparadas em balões volumétricos de vidro com capacidades entre 10,0 e 1000,0 mL. As medições de volumes rigorosos foram feitas com pipetas automáticas, modelos P20, P200, P1000 e P5000 da marca Gilson de volume regulável. Para a leitura espectrofotométrica foram utilizadas cuvets plásticas de 1 cm de percurso óptico com a capacidade de 3 mL.

O pH das soluções tampão foi ajustado com um potenciômetro da marca Crison, modelo pH meter GLP 22, com um eléctrodo de vidro combinado.

Foi utilizado um banho termostizado da marca Shakerbath, modelo SBS 30 para a dissolução de algumas soluções e para incubação (de amostras e padrões no método FRAP).

Utilizou-se para a pesagem dos reagentes uma balança analítica da marca Sartorius, modelo BP211D ( $\pm 10^{-6}$ g).

As leituras de absorvância foram efectuadas num espectrofotómetro UV-Vis da marca Shimadzu, modelo UV 2102 PC no método TRAP e num espectrofotómetro UV-Vis da marca Thermo scientific, modelo Evolution 300 para os métodos TEAC e FRAP.

## 2.3 Reagentes

Os reagentes utilizados eram de qualidade *pro analysis* (p.a.).

Foram utilizados 3 padrões, AA (Riedel-de-Haën), AG (Fluka) e Trolox (Fluka). Para a dissolução do Trolox foi utilizado Etanol absoluto (Merck).

Os reagentes utilizados em cada método e a sua marca comercial encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Reagentes utilizados em cada método e sua marca comercial.

Método	Reagente	Marca
TRAP	Acetato de sódio trihidratado	Merck
	AAPH	Aldrich
	ABTS	Fluka
	Ácido acético glacial	Merck
TEAC	ABTS	Fluka
	Persulfato de sódio	Fluka
	Hidrogenofosfato de di-potássio	Merck
	Ácido fosfórico	Panreac
FRAP	Acetato de sódio trihidratado	Merck
	Cloreto de ferro (III) hexahidratado	Merck
	Ácido acético glacial	Merck
	TPTZ	Fluka
	Ácido clorídrico comercial	Carlo Erba

Para a preparação de soluções foi utilizada água desionizada cuja condutividade era inferior a  $0,054 \mu\text{S cm}^{-1}$ .

## 2.4 Procedimentos

### 2.4.1 TRAP

É preparada uma solução de reacção com uma concentração de ABTS de 75  $\mu\text{M}$  e 2  $\mu\text{M}$  de AAPH, numa solução tampão acetato 50 mM a pH 4,3. Esta solução é incubada a 45  $^{\circ}\text{C}$  durante uma hora e, seguidamente, arrefecida à temperatura ambiente.

Junta-se 2400  $\mu\text{L}$  desta solução a 800  $\mu\text{L}$  de amostra directamente numa cuvete. Mede-se a variação de absorvância desta mistura a 734 nm após 15 minutos. A CA das amostras é calculada com base na absorvância das soluções padrão de AA, AG e Trolox. Estas são determinadas da mesma forma que a CA das amostras e utilizadas para o traçado da curva de calibração correspondente. As soluções padrão, AA, AG e Trolox apresentam os intervalos de concentração 5-140, 10-200 e 5-140  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A CA das amostras são expressas em concentrações relativas às soluções padrão em causa.

### 2.4.2 TEAC

Preparou-se uma solução de reacção contendo ABTS, 7 mM, e persulfato de sódio, 2,45 mM, numa solução tampão fosfato a pH 7. O reagente é incubado durante a noite num local escuro e seco, formando-se uma coloração azul esverdeada muito intensa. Dissolve-se 15,0 mL deste reagente em 500,0 mL de solução tampão. Junta-se 2000  $\mu\text{L}$  desta solução a 1000  $\mu\text{L}$  de amostra. A variação de absorvância é lida a 734 nm passados 15 minutos. Os intervalos de concentração usados na calibração são 15-140, 10-125 e 5-140  $\mu\text{M}$  para, respectivamente, os padrões AA, AG e Trolox. A CA das amostras é determinada de modo equivalente ao indicado para o método anterior.

### 2.4.3 FRAP

Preparou-se uma solução contendo 20,0 mL de uma solução de TPTZ, com a concentração de 20 mM, 20,0 mL de uma solução de cloreto de ferro (III), com a concentração de 20 mM e 12,0 mL de água desionizada, numa solução tampão fosfato a pH 3,6. A solução de TPTZ é preparada em ácido clorídrico 40 mM e dissolvida em banho maria a 50  $^{\circ}\text{C}$ . Junta-se 1500  $\mu\text{L}$  do reagente a 1300  $\mu\text{L}$  de solução tampão e 200  $\mu\text{L}$  de amostra e mantém-se num banho termostizado a 37  $^{\circ}\text{C}$ . A variação de absorvância é lida de 30 em 30 minutos até que o sinal analítico estabilisse. Mais uma vez a CA das amostras é determinada como nos métodos anteriores. Os intervalos de calibração para os padrões AA, AG e Trolox correspondem às concentrações 0,83-33,33, 0,83-16,67 e 0,83-33,33  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

### 3 Resultados e Discussões

Neste trabalho são analisadas 50 amostras de bebidas, entre as quais, 18 refrigerantes, 6 vinhos, 14 águas e 12 cervejas, todas de diversas marcas comerciais. A CA destas amostras é determinada por três métodos diferentes, TRAP, TEAC e FRAP e recorrendo à comparação a três padrões, AA, AG e Trolox. As amostras são caracterizadas segundo os seus constituintes, para que posteriormente seja estudado o seu efeito sobre a CA.

#### 3.1 Caracterização das amostras

Na caracterização das amostras são utilizadas variáveis estatísticas de frequências que nos permitem avaliar a natureza das amostras. As frequências absolutas indicam o número de vezes que cada elemento da variável se repete. As frequências relativas, exprimem o número de vezes que a variável se verifica face ao total de observações, são normalmente apresentadas em termos percentuais. A frequência relativa acumulada dá para cada categoria da variável a frequência de observações existentes até esse ponto, também são habitualmente expressas em percentagens.

Nas figuras seguintes pode observar-se a distribuição percentual por parâmetro constituinte das amostras analisadas. Os factores considerados são os seguintes:

- |                          |                       |
|--------------------------|-----------------------|
| ▪ Categoria da bebida;   | ▪ Conservantes;       |
| ▪ Tipo de bebida;        | ▪ Estabilizantes;     |
| ▪ Marca comercial;       | ▪ Vitaminas;          |
| ▪ Aroma;                 | ▪ Teor de sumo (%);   |
| ▪ Presença de Gás;       | ▪ Teor de álcool (%); |
| ▪ Corantes;              | ▪ Antioxidante;       |
| ▪ Edulcorantes;          | ▪ Cor.                |
| ▪ Reguladores de acidez; |                       |

As tabelas com a distribuição de frequências absolutas e relativas encontram-se no Anexo A.

Das 50 amostras em análise neste trabalho, 18 são refrigerantes, a que corresponde uma percentagem de 36%, verificando-se que este grupo apresenta a maior frequência entre todas as amostras. Seguidamente temos as águas com 28%, com 14 amostras, as cervejas com 24% e por último os vinhos com 12%, como mostra a Figura 8.

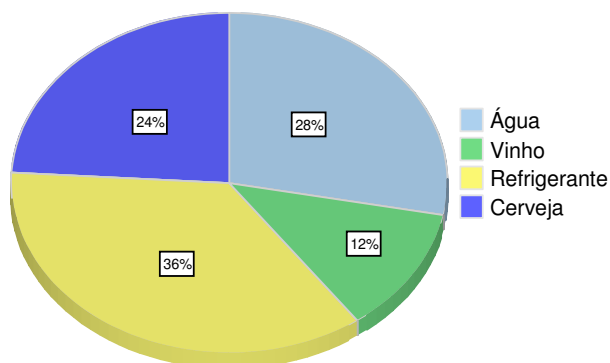


Figura 8– Distribuição percentual das amostras segundo a categoria das bebidas.

Relativamente à denominação das bebidas (ver Figura 9) as amostras podem dividir-se, dentro da sua categoria, em vários tipos. Dentro das águas existem águas naturais, que representam cerca de 6% das amostras totais e as águas aromatizadas com uma frequência relativa de 22%. As cervejas podem ser decompostas em cervejas claras e escuras, sendo as claras aquelas que apresentam a cor amarela e as escuras as que vulgarmente designamos por “pretas”. As cervejas claras representam 16% enquanto as escuras 8%. Os vinhos foram distribuídos por vinhos verdes e maduros e apresentam a mesma frequência entre si, 6%.

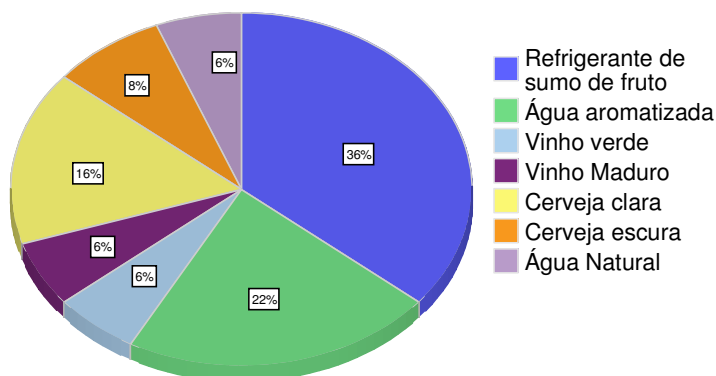


Figura 9– Distribuição percentual das amostras segundo a denominação das bebidas.

Foram analisadas 50 amostras de 23 marcas diferentes como se pode observar na Figura 10. Todas as marcas de águas, Luso, Vitalis e Jana, são constituídas por uma água natural e as restantes aromatizadas. A marca que apresenta maior frequência é a marca Luso, com 6 águas aromatizadas e 1 natural, correspondendo a 14%. As águas naturais são aqui utilizadas como controlo para a avaliação da CA. Nas marcas Super Bock, Sagres, Grimberger e Leffe apenas se incluem 2 cervejas, uma clara e outra escura, correspondendo a uma frequência de 4% cada uma. As amostras que apresentam uma frequência de 2% são as amostras de vinhos e as amostras de cerveja das marcas, Imperial, Auchan, Jumbo e Tagus pois para cada marca só é utilizada uma amostra. As marcas de refrigerantes, Jói, Trina e Frutis eram constituídos por 4 amostras cada (8%) e as Sumol, Frisumo e Continente por 2 amostras cada (4%).

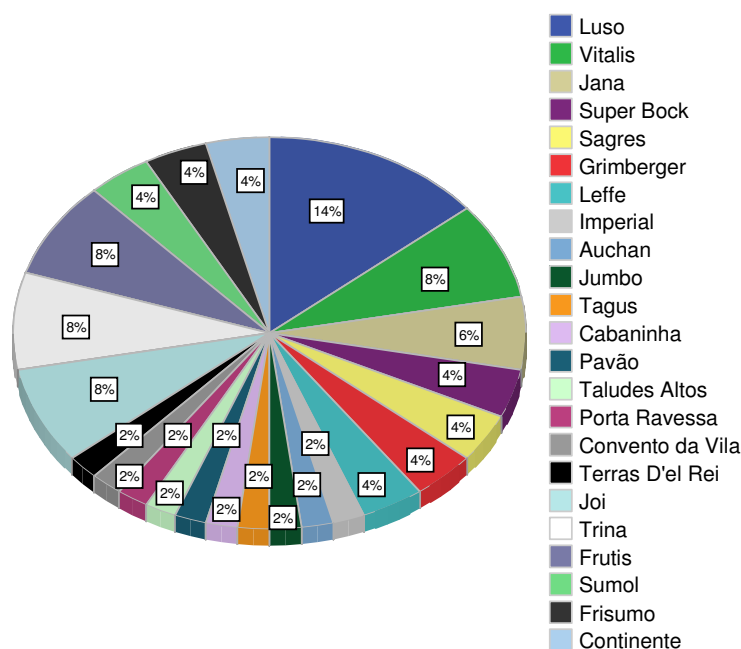


Figura 10– Distribuição percentual das amostras segundo a marca das bebidas.

As cinquenta amostras continham 9 aromas diferentes, que prefazem 58%. Ao analisar a Figura 11 conclui-se que o aroma com a maior frequência é o de ananás, representando 14% das amostras e os de menor são o aroma de pêra, kiwi e manga, que apresentam uma única referência. Existem também amostras que não contêm nenhum aroma (36%) e as amostras com aroma natural (6%).



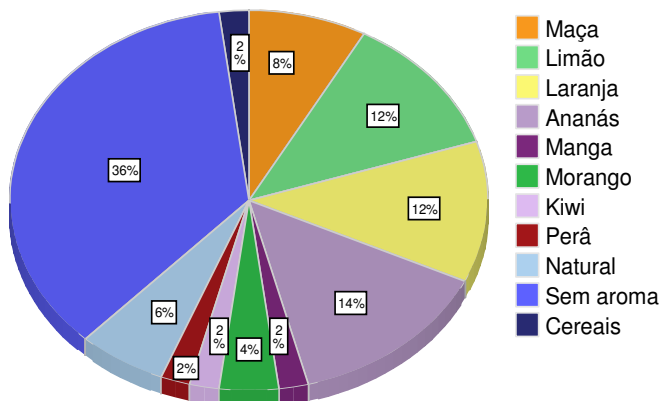


Figura 11– Distribuição percentual das amostras segundo o aroma das bebidas.

Algumas amostras apresentam gás na sua constituição. A presença de gás pode condicionar os resultados pois pode interferir com o método utilizado. Por outro lado o gás presente pode interferir com os processos de oxidação-redução da amostra. Este facto pode condicionar o carácter AO da amostra. De acordo com a Figura 12, 38% das amostras contêm gás, 4% são gaseificadas e 58 % não apresentam qualquer gás, natural ou adicionado.

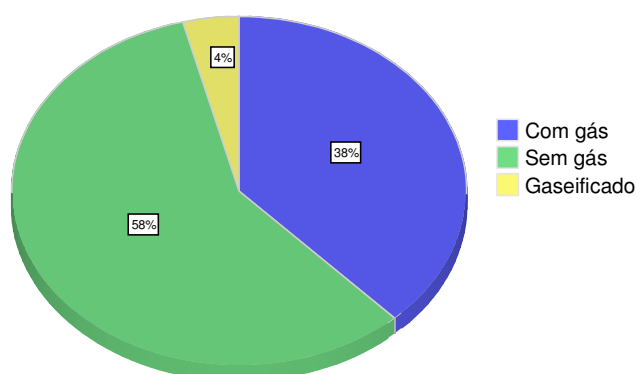


Figura 12– Distribuição percentual das amostras segundo o gás das bebidas.

Algumas amostras como os refrigerantes e as cervejas apresentam corantes na sua constituição. Os mais comuns são o caramelo e os carotenos e representam 14 e 10% das amostras, respectivamente, como mostra a Figura 13. A maioria das amostras não apresenta corantes e é correspondente a uma frequência de 72%.

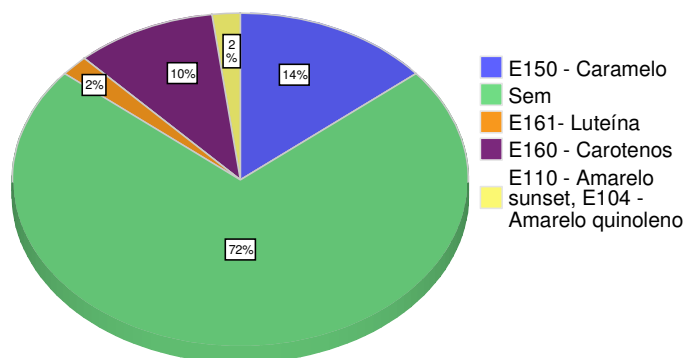


Figura 13– Distribuição percentual das amostras segundo o corante das bebidas.

Os edulcorantes são substâncias que vão dar um sabor açucarado às bebidas e a utilização de um edulcorante é específico de uma marca. A marca Luso só utiliza o acesulfame de potássio nas suas águas aromatizadas, a Frutis só utiliza a conjugação acesulfame de potássio, aspartame nos seus refrigerantes e a marca Continente só utiliza a sacarina. A adição de acesulfame de potássio é a que apresenta maior frequência, igual a 12%, (Figura 14). A sacarina e a conjugação acesulfame de potássio, aspartame, apresentam uma frequência de 4%.

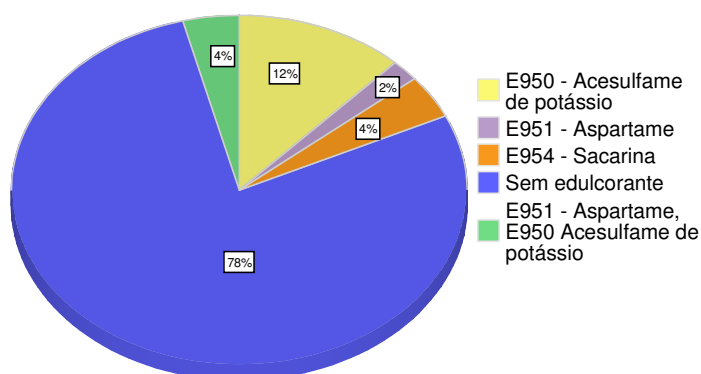


Figura 14– Distribuição percentual das amostras segundo o edulcorante das bebidas.

Outros constituintes presentes em bebidas são os reguladores de acidez, aparecendo em 26% das amostras analisadas. O que apresenta maior frequência, por análise da Figura 15, é o citrato de sódio seguido da conjugação de ácido málico com o citrato de sódio com 6%. O ácido málico apresenta uma frequência relativa de 4%. A presença destes constituintes é muito conhecida em refrigerantes, mas nesta análise verifica-se a sua presença também em águas aromatizadas.

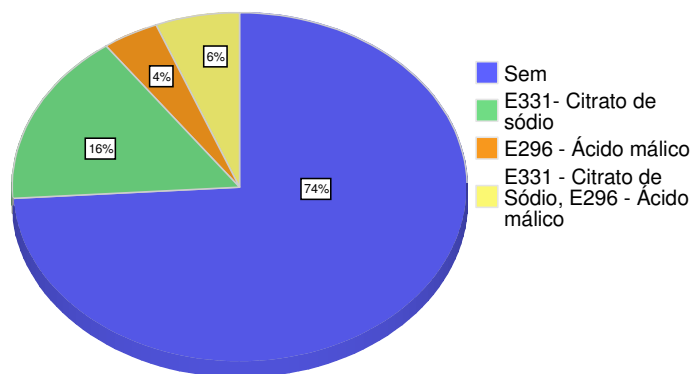


Figura 15– Distribuição percentual das amostras segundo o regulador de acidez das bebidas.

Não são conhecidas propriedades AO dos conservantes, porém foi considerada este factor visto que 50 % das amostras contêm conservantes e as suas propriedades podem interferir na determinação do valor de CA. Estes aditivos são muitas vezes utilizados em associação, como se pode observar na Figura 16. A conjugação de benzoato de sódio e sorbato de potássio é a que apresenta maior frequência, igual a 28%. O sorbato de potássio isolado apresenta uma frequência de 8%. Seguidamente encontra-se outra combinação do sorbato com dimetil-dicarbonato (6%) e com o metabisulfito de sódio (4%).

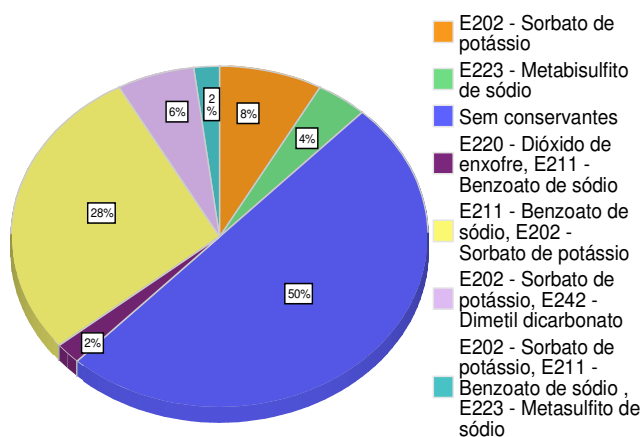


Figura 16– Distribuição percentual das amostras segundo o conservante das bebidas.

Os estabilizantes só se encontram nos refrigerantes, daí a frequência de amostras sem conservantes ser de 80%. A diversidade destes aditivos é grande e frequentemente, encontram-se em associações entre si como nos mostra a Figura 17. A conjugação de éster glicerol de "Wood Rosin" com goma arábica é a que apresenta maior frequência, 8%. Como existem várias combinações dos vários estabilizantes a frequência de algumas conjugações é muito baixa, na ordem dos 2%.

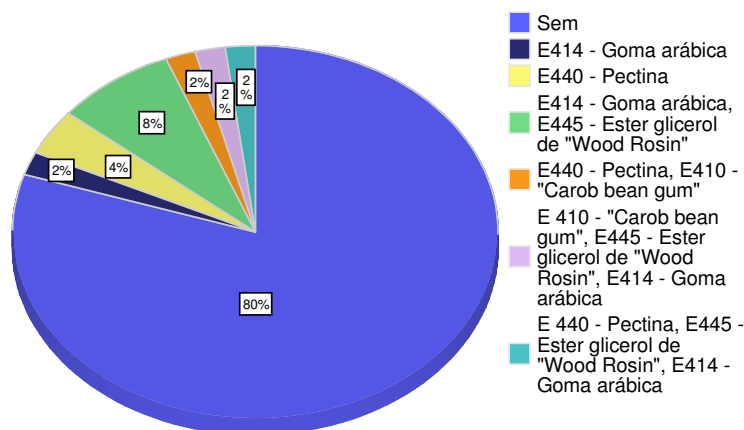


Figura 17– Distribuição percentual das amostras segundo o estabilizante das bebidas.

A vitamina mais frequente é a vitamina C, com 8%. Estes compostos não são muito utilizados na adição de bebidas, como nos mostra a Figura 18, porém o seu contributo na avaliação da CA é de extrema importância dada a sua importância AO. A vitamina B, ou suas conjugações também fazem parte deste estudo e apresentam uma frequência de 4%.

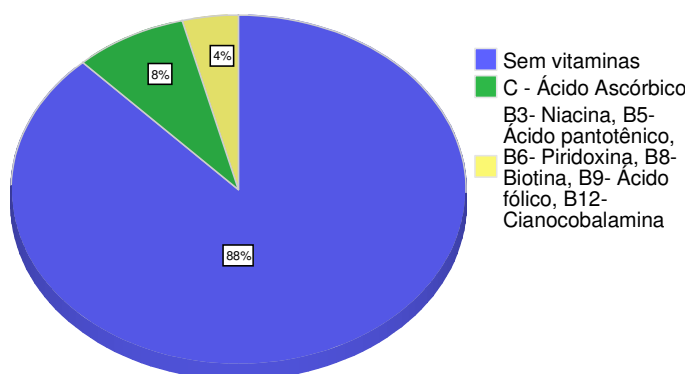


Figura 18– Distribuição percentual das amostras segundo as vitaminas das bebidas.

Os refrigerantes contêm uma percentagem de sumo na sua composição. Este facto é importante na medida que os frutos possuem várias substâncias com propriedades antioxidantes. Como já foi referido anteriormente, o teor mínimo de sumo de maçã, limão, laranja e ananás adicionado a uma bebida refrigerante é de 16, 6, 8 e 10%, respectivamente. Segundo a Figura 19, o teor de sumo com maior frequência é o de 6% que apresenta uma frequência de 12%. Seguidamente temos com uma frequência relativa de 10%, os refrigerantes com 8% de teor em sumo e com uma frequência de 6% os de 10 e 16% de teor de sumo. Como das bebidas analisadas só é adicionado sumo aos refrigerantes, a frequência de teor de sumo 0% têm uma frequência elevada, 64%.

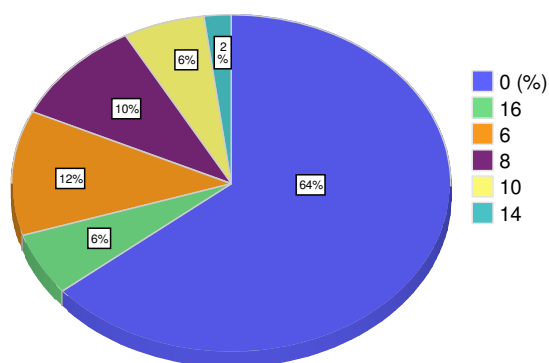


Figura 19– Distribuição percentual das amostras segundo o teor de sumo das bebidas.

As bebidas utilizadas neste estudo que contêm álcool na sua constituição são os vinhos e as cervejas. Como se pode observar na Figura 20, 12 % das amostras contêm um teor alcoólico de 5%, o que representa maior frequência observada, encontrando-se aqui a maior parte das cervejas claras. Os refrigerantes e águas não possuem álcool e representam os 64% das amostras analisadas, com teor alcoólico de 0%. Os vinhos maduros apresentam um teor alcoólico de 13% e a sua frequência relativa é de 6%, correspondendo a 3 amostras. Com uma frequência de 4% encontram-se as amostras com teor de álcool de 9 e 10%.

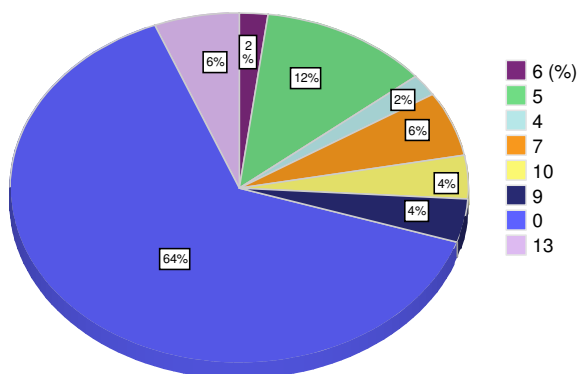


Figura 20– Distribuição percentual das amostras segundo o teor de álcool das bebidas.

A algumas bebidas são adicionadas substâncias AOs. O AO mais comum é o AA que apresenta a frequência de 40% da totalidade das amostras analisadas. Por observação da Figura 21 verifica-se que 12% das amostras possuem na sua constituição sulfitos, nomeadamente os vinhos. As amostras que não contêm nenhum AO adicionado representam 48%.

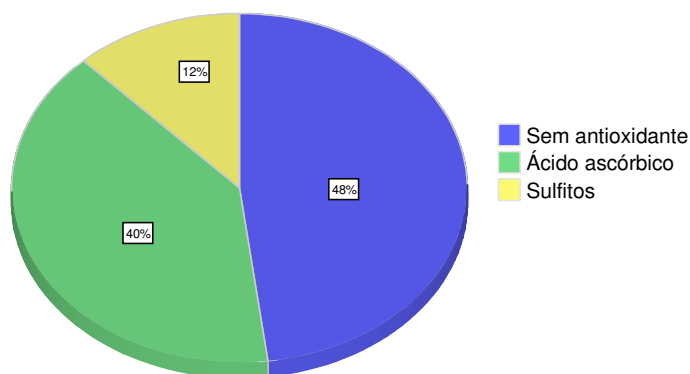


Figura 21– Distribuição percentual das amostras segundo o AO das bebidas.

Apesar da cor da bebida não influenciar directamente a determinação da CA, devido ao elevado grau de diluição, esta pode ser associada a determinado tipo de bebidas e de características dessas bebidas e, neste contexto, fornece-nos uma informação relevante ao nível da CA das mesmas. As bebidas que são incolores apresentam uma frequência de 28%, sendo a maior frequência, como podemos observar na Figura 22. Seguidamente com 22% temos as amostras amarelas onde podemos incluir alguns sumos e as cervejas claras. As bebidas com uma coloração laranja, sumos de laranja, representam 18% da amostragem. As amostras verde-amareladas correspondem aos vinhos e representam 12%. Com uma frequência de 14% temos as amostras que apresentam uma cor acastanhada, estas amostras são os sumos de maçã e as cervejas escuras.

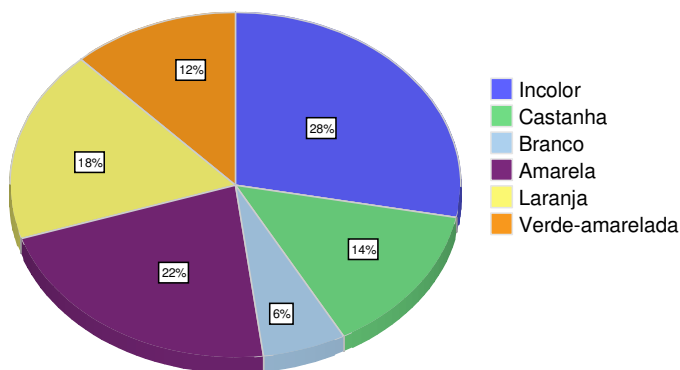


Figura 22– Distribuição percentual das amostras segundo a cor das bebidas.

### 3.2 Determinação da capacidade antioxidante

A avaliação da CA das bebidas analisadas deve fornecer informação relativamente ao grau de protecção que as mesmas são capazes de prover.

Neste trabalho a CA é determinada por três métodos e em comparação com três padrões referência, o AA, o AG e o Trolox. Os métodos utilizados são o TRAP, o TEAC e o FRAP. Os valores obtidos não devem ser comparados entre si directamente pois estes dependem na natureza do método associado à sua determinação e do padrão utilizado como referência.

O método FRAP é analisado ao longo do tempo, medindo-se a CA de 30 em 30 minutos, do tempo 0 até 240 minutos (ver tabelas 20 à 35 no Anexo B). O processo de redução do ferro (III) a ferro (II) está concluído. Findo este período consideram-se apenas os valores obtidos ao fim de 210 minutos, tempo suficiente para se atingir a estabilidade (ver figuras 1 à 15 do Anexo B).

#### 3.2.1 Refrigerantes

Na Tabela 4 são indicados os valores da CA para as amostras de refrigerantes para os três métodos e para os três padrões. Os valores obtidos de CA variam entre 101  $\mu\text{M}$  e 7359  $\mu\text{M}$ . Genericamente, o método que origina os resultados mais elevados de CA é o método TEAC. Este é o método que apresenta os valores mais uniformes e próximos entre si e que compreendem uma amplitude de 3006  $\mu\text{M}$ . Para os métodos FRAP e TRAP verifica-se que as amostras 1, 5 e 9 são as que apresentam valores mais elevados e, no caso do método TRAP, a diferença entre estas três amostras e as restantes é bastante acentuada. Estas três amostras são de refrigerantes de maçã. Observa-se também que no método FRAP as amostras 13 à 18 apresentam valores relativamente mais baixos que as restantes amostras, de notar que estas 6 amostras são de refrigerantes com gás ou gaseificados. De uma forma geral, os valores dos padrões AA e Trolox são mais elevados que os do padrão AG.

Tabela 4 – Valores da CA para as amostras de refrigerante para os vários métodos e padrões.

N.º	Métodos								
	TRAP			TEAC			FRAP (t=210 min)		
	Concentração (µM)			Concentração (µM)			Concentração (µM)		
	AA	AG	Trolox	AA	AG	Trolox	AA	AG	Trolox
1	1.709 ± 146	1.260 ± 168	1.286 ± 126	2.942 ± 11	2.244 ± 12	3.620 ± 15	1.455 ± 42	603 ± 18	1.462 ± 42
2	670 ± 2	177 ± 1	557 ± 2	3.367 ± 8	2.710 ± 9	4.228 ± 11	948 ± 59	397 ± 26	952 ± 60
3	555 ± 4	143 ± 1	454 ± 3	3.382 ± 45	2.727 ± 49	4.250 ± 64	1.072 ± 36	451 ± 16	1.076 ± 36
4	658 ± 11	173 ± 3	546 ± 10	3.363 ± 66	2.706 ± 73	4.223 ± 95	1.024 ± 34	430 ± 15	1.028 ± 34
5	7.359 ± 224	7.067 ± 259	5.982 ± 194	3.562 ± 13	2.924 ± 15	4.507 ± 19	1.421 ± 134	588 ± 58	1.427 ± 135
6	628 ± 10	164 ± 3	520 ± 8	3.780 ± 24	3.162 ± 26	4.818 ± 34	998 ± 78	418 ± 34	1.001 ± 8
7	412 ± 11	101 ± 3	328 ± 10	3.845 ± 5	3.234 ± 6	4.911 ± 8	1.041 ± 41	437 ± 18	1.045 ± 4
8	646 ± 26	170 ± 8	536 ± 23	3.812 ± 27	3.197 ± 29	4.863 ± 38	978 ± 120	410 ± 52	982 ± 12
9	5.725 ± 170	5.181 ± 197	4.568 ± 148	3.678 ± 77	3.051 ± 84	4.673 ± 110	1.162 ± 229	476 ± 99	1.168 ± 230
10	648 ± 33	170 ± 10	537 ± 29	2.632 ± 56	1.905 ± 61	3.178 ± 80	972 ± 123	407 ± 53	976 ± 123
11	548 ± 22	141 ± 7	448 ± 20	3.315 ± 61	2.653 ± 67	4.153 ± 87	1.045 ± 22	439 ± 9	1.049 ± 22
12	625 ± 6	163 ± 2	517 ± 5	2.898 ± 61	2.197 ± 67	3.559 ± 87	1.044 ± 17	438 ± 7	1.048 ± 17
13	442 ± 15	110 ± 4	354 ± 13	3.718 ± 74	3.095 ± 81	4.729 ± 106	507 ± 59	235 ± 28	820 ± 95
14	643 ± 28	169 ± 8	533 ± 25	2.857 ± 29	2.151 ± 32	3.500 ± 42	350 ± 50	160 ± 24	565 ± 81
15	646 ± 4	170 ± 1	535 ± 4	3.731 ± 66	3.109 ± 73	4.748 ± 95	533 ± 103	247 ± 49	862 ± 167
16	649 ± 4	170 ± 1	538 ± 3	2.915 ± 80	2.215 ± 87	3.583 ± 114	403 ± 76	185 ± 36	651 ± 123
17	412 ± 5	101 ± 1	328 ± 4	2.921 ± 50	2.221 ± 55	3.591 ± 72	404 ± 125	186 ± 60	652 ± 203
18	656 ± 6	173 ± 2	545 ± 6	2.696 ± 72	1.975 ± 78	3.270 ± 102	401 ± 81	185 ± 39	648 ± 132



### 3.2.2 Vinhos

Os valores de CA para as amostras de vinho para os três padrões e para os três métodos estão apresentados na Tabela 5 e estão compreendidos entre 495 e 22160  $\mu\text{M}$ . Os valores obtidos pelo método TEAC são os que apresentam os maiores valores de CA, nos três padrões estudados. No método TRAP os valores mais elevados de CA são para o padrão de AA enquanto nos outros métodos é o Trolox que apresenta os valores mais elevados, observando-se uma diferença significativa entre os padrões de AA e AG e o Trolox no método TEAC. Apesar de as amostras 19, 20 e 21 serem de vinho verde e as 22, 23 e 24 serem de vinho maduro, não se observa uma tendência que revele que um destes grupos apresente maior CA do que o outro.

Tabela 5 – Valores da CA para as amostras de vinho para os vários métodos e padrões.

N.º	Métodos								
	TRAP			TEAC			FRAP (t=210 min)		
	Concentração ( $\mu\text{M}$ )			Concentração ( $\mu\text{M}$ )			Concentração ( $\mu\text{M}$ )		
	AA	AG	Trolox	AA	AG	Trolox	AA	AG	Trolox
19	6.849 $\pm$ 94	6.479 $\pm$ 108	5.541 $\pm$ 81	16.920 $\pm$ 0	13.644 $\pm$ 0	21.263 $\pm$ 0	1.498 $\pm$ 322	495 $\pm$ 123	1.658 $\pm$ 333
20	7.506 $\pm$ 75	7.237 $\pm$ 87	6.110 $\pm$ 65	17.483 $\pm$ 106	14.260 $\pm$ 116	22.066 $\pm$ 152	2.246 $\pm$ 518	782 $\pm$ 199	2.432 $\pm$ 536
21	7.763 $\pm$ 18	7.533 $\pm$ 21	6.332 $\pm$ 16	16.404 $\pm$ 623	13.079 $\pm$ 683	20.526 $\pm$ 890	3.040 $\pm$ 562	1.086 $\pm$ 215	3.254 $\pm$ 581
22	4.438 $\pm$ 4	4.408 $\pm$ 4	3.647 $\pm$ 3	17.548 $\pm$ 13	14.332 $\pm$ 15	22.160 $\pm$ 19	1.762 $\pm$ 106	596 $\pm$ 41	1.932 $\pm$ 110
23	7.744 $\pm$ 117	7.511 $\pm$ 135	6.315 $\pm$ 101	17.258 $\pm$ 849	14.014 $\pm$ 930	21.745 $\pm$ 1212	1.126 $\pm$ 139	353 $\pm$ 53	1.273 $\pm$ 144
24	6.360 $\pm$ 46	5.914 $\pm$ 53	5.117 $\pm$ 40	13.573 $\pm$ 331	9.976 $\pm$ 363	16.481 $\pm$ 474	1.611 $\pm$ 139	539 $\pm$ 53	1.776 $\pm$ 144

### 3.2.3 Águas

As amostras 25, 32 e 36 são amostras de águas naturais, pelo que os valores obtidos de CA são relativamente baixos. No método FRAP foi mesmo impossível quantificar estes valores. Concluiu-se pela observação da Tabela 6, que em todos os métodos e em todos os padrões as amostras 37 e 38 apresentam os valores mais elevados de CA. Estas duas amostras de água são as únicas que têm AA adicionado à sua composição. As amostras 33 e 34 apresentam também um valor elevado no método TEAC para os três padrões, já para o TRAP só a amostra 34 tem um valor alto e no FRAP só a amostra 33. Estas duas amostras contêm vitaminas adicionadas mas não se pode associar exclusivamente o facto de estas amostras conterem vitaminas e o seu valor de CA ser mais elevado porque, primeiro, a comparação entre os métodos e os padrões não o permite e, segundo, existem outras diferenças na composição destas duas águas aromatizadas. A amostra 33 contém aroma de limão e magnésio, enquanto que a amostra 34 tem aroma de maçã e chá branco e ainda contém ácido málico.

Verifica-se também que no método FRAP os valores de CA são maiores que nos outros métodos. A amplitude dos seus valores é também superior, sendo de 1684  $\mu\text{M}$  para este método e de 752 e 873  $\mu\text{M}$  para os métodos TRAP e TEAC, respectivamente.

Tabela 6 – Valores da CA para as amostras de água para os vários métodos e padrões.

N.º	Métodos								
	TRAP			TEAC			FRAP (t=210 min)		
	Concentração (µM)			Concentração (µM)			Concentração (µM)		
	AA	AG	Trolox	AA	AG	Trolox	AA	AG	Trolox
25	43 ± 0	44 ± 0	20 ± 0	117 ± 4	30 ± 4	108 ± 6	ND	ND	ND
26	75 ± 10	74 ± 10	43 ± 7	154 ± 2	71 ± 2	162 ± 3	704 ± 55	347 ± 27	726 ± 58
27	67 ± 31	66 ± 30	37 ± 22	265 ± 0	193 ± 0	321 ± 0	732 ± 83	361 ± 41	754 ± 86
28	85 ± 8	84 ± 8	50 ± 6	169 ± 2	87 ± 2	183 ± 3	184 ± 34	91 ± 17	184 ± 35
29	94 ± 9	93 ± 8	57 ± 6	275 ± 3	203 ± 3	334 ± 4	885 ± 137	436 ± 67	913 ± 142
30	103 ± 12	101 ± 11	63 ± 9	223 ± 3	146 ± 3	260 ± 4	839 ± 148	413 ± 73	865 ± 154
31	66 ± 1	65 ± 1	36 ± 1	169 ± 1	88 ± 1	184 ± 2	138 ± 98	68 ± 48	135 ± 102
32	47 ± 0	48 ± 0	23 ± 0	112 ± 4	24 ± 4	101 ± 5	ND	ND	ND
33	89 ± 15	87 ± 14	53 ± 10	601 ± 6	462 ± 6	742 ± 8	898 ± 96	443 ± 47	927 ± 100
34	222 ± 9	214 ± 8	147 ± 6	676 ± 45	545 ± 49	849 ± 64	107 ± 45	53 ± 22	103 ± 46
35	40 ± 3	41 ± 3	18 ± 2	256 ± 5	182 ± 5	307 ± 7	634 ± 68	313 ± 34	652 ± 71
36	49 ± 1	49 ± 1	24 ± 1	116 ± 2	30 ± 2	108 ± 3	ND	ND	ND
37	722 ± 9	694 ± 8	493 ± 6	709 ± 1	581 ± 1	897 ± 2	1.684 ± 228	830 ± 112	1.737 ± 238
38	770 ± 10	740 ± 9	527 ± 7	677 ± 1	546 ± 1	851 ± 2	1.649 ± 246	813 ± 121	1.701 ± 257

### 3.2.4 Cervejas

Como se pode observar na Tabela 7, os valores de CA entre os métodos variam grandemente. O método FRAP é aquele que apresenta os valores mais elevados, apresentando valores 2000 vezes superiores. A amostra que apresenta o maior valor de CA, independentemente do método ou do padrão, é a amostra 40. Esta amostra é de uma cerveja escura. Genericamente as amostras que apresentam os valores mais baixos de CA são as amostras 48 e 49. Se compararmos as cervejas claras com as escuras, verificamos que as escuras apresentam um valor de CA mais elevado do que a sua homóloga clara.

Tabela 7 – Valores da CA para as amostras de cerveja para os vários métodos e padrões.

N.º	Métodos								
	TRAP			TEAC			FRAP (t=210 min)		
	Concentração (µM)			Concentração (µM)			Concentração (µM)		
	AA	AG	Trolox	AA	AG	Trolox	AA	AG	Trolox
39	1.502 ± 11	452 ± 5	1.771 ± 15	712 ± 82	189 ± 26	709 ± 102	912.652 ± 5	276.876 ± 48	819.004 ± 174
40	1.999 ± 7	670 ± 3	2.437 ± 9	1.099 ± 31	313 ± 10	1.190 ± 38	2.214.550 ± 13	607.287 ± 8	1.805.985 ± 38
41	1.603 ± 23	496 ± 10	1.906 ± 30	630 ± 112	163 ± 36	606 ± 139	1.103.622 ± 88	307.612 ± 32	910.816 ± 119
42	1.767 ± 11	568 ± 5	2.125 ± 15	799 ± 15	217 ± 5	817 ± 19	1.305.608 ± 13	373.694 ± 10	1.108.212 ± 28
43	1.555 ± 9	475 ± 4	1.842 ± 12	659 ± 14	172 ± 4	643 ± 17	1.196.702 ± 77	568.898 ± 37	1.170.485 ± 177
44	1.971 ± 16	657 ± 7	2.398 ± 21	883 ± 38	244 ± 12	921 ± 47	1.619.138 ± 8	769.127 ± 4	1.591.780 ± 45
45	1.835 ± 54	598 ± 24	2.217 ± 72	894 ± 18	248 ± 6	935 ± 22	1.451.257 ± 179	689.553 ± 85	1.424.352 ± 25
46	1.727 ± 248	550 ± 108	2.072 ± 332	982 ± 47	276 ± 15	1.045 ± 59	1.707.373 ± 44	810.950 ± 21	1.679.777 ± 9
47	1.510 ± 95	456 ± 41	1.782 ± 127	651 ± 64	170 ± 21	632 ± 80	1.328.664 ± 606	631.446 ± 287	1.302.091 ± 124
48	1.281 ± 5	355 ± 2	1.475 ± 6	709 ± 52	188 ± 17	705 ± 65	890.612 ± 194	423.814 ± 92	865.222 ± 64
49	1.542 ± 18	470 ± 8	1.825 ± 24	689 ± 25	182 ± 8	680 ± 31	852.351 ± 47	405.679 ± 23	827.064 ± 196
50	1.145 ± 38	296 ± 17	1.294 ± 51	766 ± 27	207 ± 8	776 ± 33	1.240.429 ± 0	589.624 ± 0	1.214.094 ± 13

### 3.3 Influência de alguns factores na CA

Considerando que os valores de CA para as mesmas amostras são diferentes quando obtidos por métodos diferentes e quando comparados com padrões diferentes, é necessário estudar a influência dos vários parâmetros que diferem de amostra para amostra, como por exemplo, a marca, os aromas, a presença de gás, os aditivos adicionados e também o efeito do método e do padrão utilizado. Esta avaliação pressupõe uma análise estatística dos resultados, descritiva e inferencial dos dados.

A análise descritiva de cada variável abrange um conjunto de parâmetros estatísticos, como a média, variância no intervalo confiança, desvio padrão, mínimo e máximo adequadas à interpretação dos dados, à sua representação gráfica, em caixas de bigodes e a identificação de observações aberrantes, moderadas ou severas.

A caixa de bigodes é um rectângulo que assinala os quartis da distribuição. Nos extremos de cada bigode posicionam-se as observações mínima e máxima. Todas as observações fora da caixa de bigodes são observações aberrantes. A caixa estende-se do 1º quartil ao 3º quartil, que são respectivamente as bases inferior e superior do rectângulo, descrevendo as observações centrais, ou seja, que correspondem a 50% das observações totais. A mediana é representada pela linha grossa dentro da caixa. Um dos bigodes estende-se até à observação mínima que não seja uma observação aberrante e o outro estende-se até à observação máxima que não seja também uma observação aberrante. O comprimento máximo dos bigodes vai até 1,5 vezes o valor da amplitude inter-quartil. As observações aberrantes são marcadas fora dos limites da caixa de bigodes com um círculo ou com um asterisco, consoante sejam respectivamente observações aberrantes moderadas ou severas [20].

Em termos inferenciais, ou seja para efeitos da generalidade dos resultados obtidos na amostra para a totalidade da população de onde provêm, comparam-se as várias proporções procedendo-se a testes de aderência de normalidade, no nosso caso foi aplicado o teste de *Shapiro-Wilk*. Este teste permite inferir sobre a normalidade das distribuições de CA. A distribuição dos resultados é normal quando o valor de  $p$  for superior a 0,01 para um intervalo de confiança de 99%.

A análise de comparação de médias foi efectuada utilizando o Anova univariada, ou *One-Way Anova*.

O teste Anova analisa o efeito de um factor na variável dependente, testando se as média da variável dependente em cada categoria do factor são ou não iguais entre si. É uma extensão do teste  $t$  de *Student* usado na comparação de duas médias, pois o Anova permite comparar duas ou mais médias.

Quando se testa a igualdade de duas ou mais médias, e dependendo da natureza nominal ou ordinal do factor, recorre-se aos testes *Post-Hoc*, à análise da tendência ou às comparações planeadas, para saber quais as médias que se diferenciam entre si. Para se inferir sobre a igualdade das dispersões dos vários grupos utiliza-se o *teste de Levene*, ou de homogeneidade de variâncias, se  $p$  for igual a 0,01 não se rejeita a homocedasticidade [20]. Foi necessário, por vezes, recorrer à transformação logarítmica dos dados experimentais para ser possível a análise dos resultados obtidos e para garantir que os valores de CA estavam distribuídos de modo simétrico. No caso particular da análise dos factores método e padrão a transformação logarítmica dos valores de CA não conduziu a normalidade e, para evitar uma análise não-paramétrica, recorreu-se à transformação dos valores de CA em seno de CA. Esta transformação não é a mais correcta visto que a função seno é uma função cíclica que varia entre -1 e 1 e permite sempre a normalidade dos valores.

De seguida apresenta-se a análise da influência dos vários factores na determinação da CA por tipo de amostra.

### 3.3.1 Refrigerantes

Existem muitos factores que podem influenciar a determinação da CA das bebidas. Os factores estudados para as bebidas refrigerantes são os seguintes: marca comercial, aroma, presença de gás, corantes, edulcorantes, reguladores de acidez, conservantes, estabilizantes, vitaminas, teor de sumo, cor, efeito do método e do padrão.

#### 3.3.1.1 Efeito da marca comercial

Os valores de CA não se encontram distribuídos de modo simétrico, pois o teste *Shapiro-Wilk* apresentou valores de significância inferiores a 0,01. Neste caso, recorre-se à transformação logarítmica dos dados experimentais. Verifica-se que a distribuição do logaritmo de CA ( $\log CA$ ) apresenta normalidade, sendo que os valores de significância variam entre 0,042 para a marca Frisumo e 0,259 para a marca Continente.

A caixa de bigodes da variável CA não transformada pode ser encontrada na Figura 16-C, Anexo C. Esta imagem não é perceptível e não é possível retirar muitas conclusões da mesma. Com a transformação indicada obtém-se a caixa de bigodes representada na Figura 23. Podemos concluir que os valores médios são semelhantes entre todas as marcas. As marcas Trina e Continente apresentam os valores mínimos de CA, a marca Trina apresenta também o valor máximo, o que nos leva a concluir que esta

marca é a que apresenta a maior amplitude de variação de valores de CA. Todos os parâmetros estatísticos estão descritos na Tabela 33-C, Anexo C.

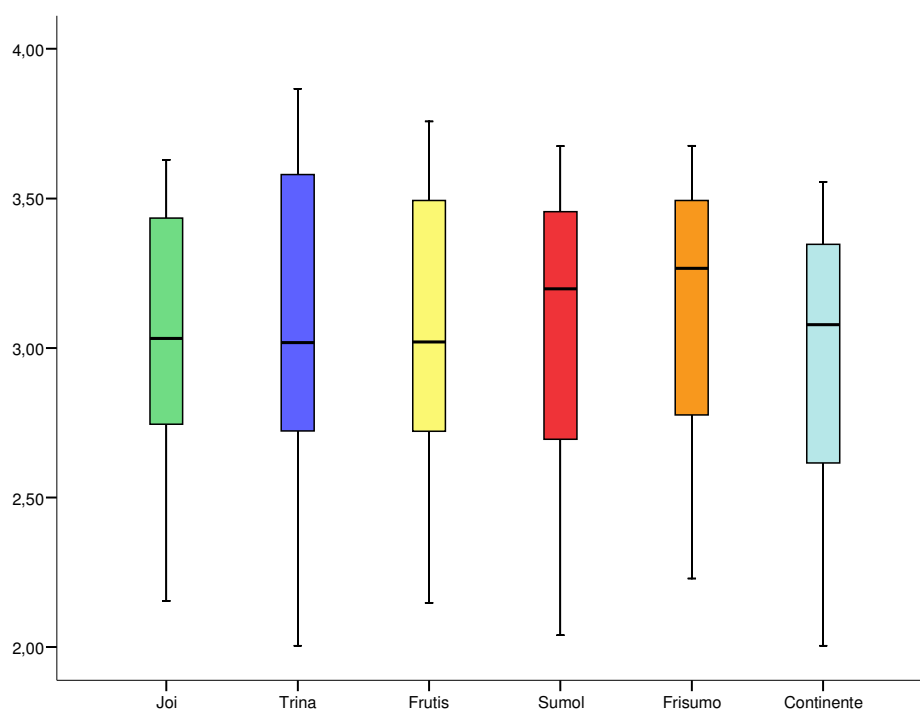


Figura 23 – Caixa de bigodes dos valores de LogCA, relativa à marca comercial das bebidas refrigerantes.

Pela aplicação do teste Anova, para a comparação de médias, podemos concluir que o pressuposto da homocedasticidade é verificado, o valor de  $p$  para o teste de *Levene* é 0,610. O teste F apresenta um valor de significância de 0,917, logo sugere que as amostras são semelhantes e, como se pode observar na Tabela 34-C, Anexo C, os testes *Post-Hoc* só apresentam um sub-conjunto, para o intervalo de confiança de 99%. Ou seja não podemos associar nenhuma marca a possuir uma CA diferenciada. Não existem diferenças estatisticamente significativas entre as marcas observadas.

### 3.3.1.2 Efeito dos aromas

Após uma abordagem mais detalhada sobre os valores de CA obtidos segundo o aroma (ver Figura 17-C, Anexo C) parece importante inferir sobre a influência deste factor na CA. Os valores de CA apresentam uma distribuição normal, com o valor de  $p$  a variar entre 0,01 e 0,984. Todos os parâmetros estatísticos correspondentes encontram-se na Tabela 35-C, Anexo C. Observamos que o aroma de maçã é o que apresenta o valor médio de CA mais elevado, 7359  $\mu\text{M}$  e o aroma de laranja apresenta o valor mais baixo,

101  $\mu\text{M}$ . O aroma de maçã é o que apresenta a maior amplitude de variação de resultados, sendo o valor mínimo de 476  $\mu\text{M}$  e o máximo de 7359  $\mu\text{M}$ .

A Figura 24 é uma modificação da caixa de bigodes original. Todos os valores de TRAP e FRAP para os aromas de limão, laranja e ananás foram aumentados 3 vezes, tal como os valores de FRAP para o aroma de maçã. Esta modificação foi realizada para melhorar a observação das caixas e assim mais facilmente comparar os valores obtidos.

A amostra 15 é uma observação aberrante severa para o FRAP, em comparação com os padrões de AG e AA e moderada para o Trolox.

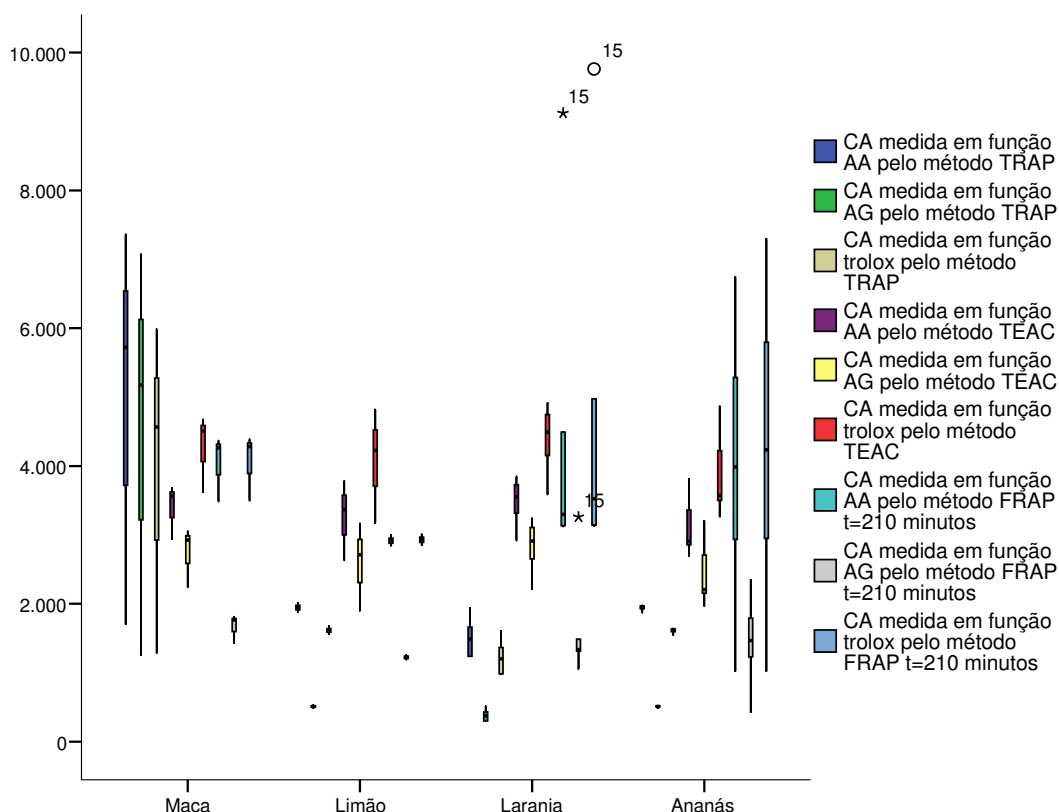


Figura 24 - Caixa de bigodes dos valores de CA, relativa aos aromas das bebidas refrigerantes.

O valor de significância do teste de *Levene* vê associado um nível superior a 0,01, confirmando a homocedasticidade. O teste *F* apresenta uma significância de 0,007, o que sugere que exista pelo menos um grupo de amostras que é diferente dos restantes.

Na análise dos teste *Post-Hoc* (ver Tabela 36-C, Anexo C), verificamos que para um *subset of alpha* de 0,01 aparecem dois sub-conjuntos homogêneos de médias. O grupo de amostras que é diferente é o grupo de amostras com aroma de maçã. Podemos concluir que o aroma de maçã se distingue estatisticamente dos restantes, apresentando de uma forma geral um valor de CA mais elevado.



### 3.3.1.3 Efeito da presença de gás

A presença de gás carbônico poderia interferir de forma química na determinação da CA ou no método e por isso mesmo foi tomada em consideração nesta análise. Na tabela 37-C, Anexo C, são apresentados todos os parâmetros estatísticos referentes à presença de gás nas amostras de bebidas refrigerantes. Os valores médios de cada grupo não diferem grandemente uns dos outros, sendo que o mais elevado tem o valor de 1836  $\mu\text{M}$  para as amostras com gás e o mais baixo tem o valor de 1420  $\mu\text{M}$  para as amostras gaseificadas.

As amostras 1, 5 e 9 são observações aberrantes para as amostras que não contêm gás na sua constituição, como podemos observar na Figura 25.

De uma forma geral verifica-se que o método TEAC apresenta os valores mais elevados de CA e normalmente apresenta também uma maior amplitude de valores.

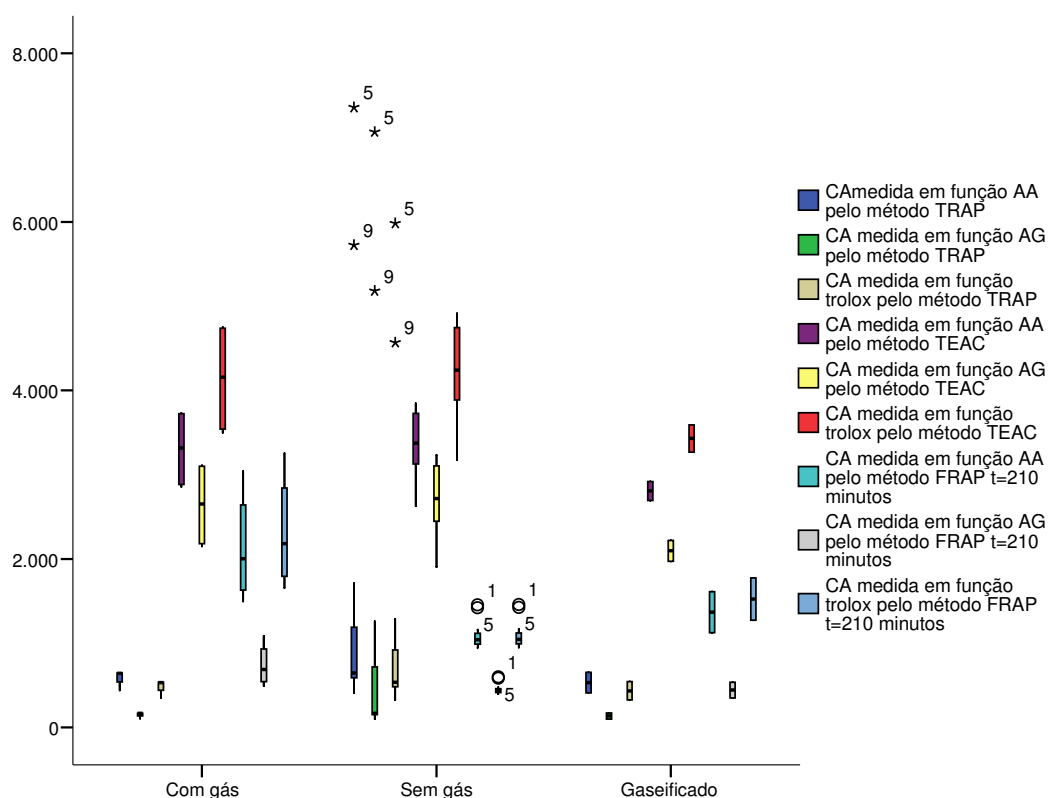


Figura 25 - Caixa de bigodes dos valores de CA, relativa à presença de gás nas bebidas refrigerantes.

O pressuposto de normalidade não é verificado pois os valores de significância do teste de *Levene* são para a maioria dos métodos inferiores a 0,01. Os valores de CA foram transformados para logaritmo de CA. Após esta transformação o pressuposto da normalidade já se verifica pois os valores de significância estão compreendidos entre 0,01 e 0,259.

Na verificação do pressuposto da homocedasticidade o teste de *Levene* apresenta uma significância de 0,026, logo existe homocedasticidade.

Com o teste Anova é pretendido aferir, se no conjunto de todas as amostras existe algum sub-conjunto se destaca. O teste F teve uma significância de 0,471, conduzindo à aceitação de que nenhum sub-conjunto de amostra apresenta valores de CA que sejam estatisticamente diferentes (ver dados estatísticos na Tabela 38-C, Anexo C).

#### 3.3.1.4 Efeito dos corantes

Foi necessário analisar o efeito dos corantes adicionados às bebidas refrigerantes pois vários estudos referem que algumas das substâncias que são utilizadas como corantes possuem propriedades AOs. Os parâmetros descritivos relativos aos corantes podem ser consultados na Tabela 39-C, Anexo C e na Figura 18-C, Anexo C, apresenta-se a caixa de bigodes original para os valores de CA relativos aos corantes.

O aditivo E150, ou vulgar caramelo, é o corante que apresenta o valor médio de CA mais elevado com 2370  $\mu\text{M}$ . Verifica-se que o caramelo é o corante que apresenta a maior amplitude de valores de CA, sendo os seus valores mínimo e máximo de 101 e 7359  $\mu\text{M}$ , respectivamente. As amostras 7 e 15 são observações aberrantes para o corante E160, ou carotenos. Para o corante caramelo, a amostra 18 é também uma observação aberrante, assim como a amostra n.º 13 para as amostras que não contêm corantes adicionados.

Como o pressuposto de normalidade não foi verificado para o teste de *Shapiro-Wilk*, procede-se à transformação dos valores de CA para logCA.

Figura 26 apresenta a caixa de bigodes relativa aos aromas com os valores de LogCA. Os resultados parecem indicar que nenhum corante apresenta valores estatisticamente distintos e que os seus valores médios são semelhantes. Com esta transformação já se verifica o pressuposto de normalidade, sendo que os valores de  $p$  variam entre 0,01 e 0,723.

O pressuposto de homocedasticidade é verificado para um nível de significância de 0,222, pelo teste de *Levene*. Neste estudo Anova pretende-se saber se o valor de CA seria igual para qualquer corante, utilizando-se para isso o teste F. Os resultados deste teste indicaram um valor de  $p$  igual a 0,145. Neste sentido pode concluir-se que não existem grupos com valores de CA estatisticamente diferentes dos restantes. Consequentemente e assumindo um intervalo de confiança de 99%, o teste Anova fornece um sub-conjunto homogêneo de médias (ver Tabela 40-C, Anexos C).

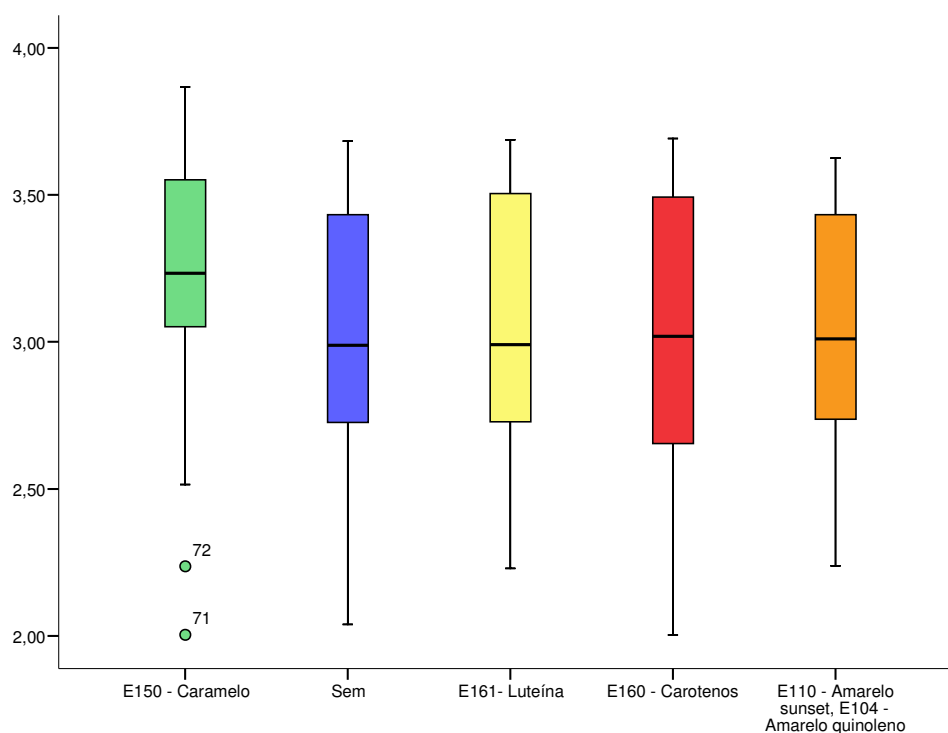


Figura 26 - Caixa de bigodes dos valores de LogCA, relativa aos corantes para as bebidas refrigerantes.

### 3.3.1.5 Efeito dos edulcorantes

Os parâmetros estatísticos relativos aos edulcorantes, substâncias que pretendem dar um sabor açucarado às bebidas, encontram-se no Anexo C, Tabela 41-C. O valor médio mais elevado é o da associação de edulcorantes, E951, E950, sendo o seu valor 2343  $\mu\text{M}$ . O valor mais baixo, 1420  $\mu\text{M}$ , representa as amostras com o edulcorante E954.

A caixa de bigodes destes dados (Figura 19-C, Anexo C), indica que as amostras 1, 5, 7, 13 e 15 são observações aberrantes para o conjunto de amostras que não contém edulcorantes na sua constituição. Observa-se que a conjugação de edulcorantes E951 e E950 apresenta a maior dispersão de valores.

Relativamente ao pressuposto de normalidade este não é verificado e foi necessário transformar os valores de CA para logaritmico de CA. Os valores relativos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* com a variável transformada apresentam valores de significância entre 0,01 e 0,637. Na Figura 27 apresenta-se a caixa de bigodes relativa aos edulcorantes com os valores transformados de CA.

Os resultados parecem indicar que os valores médios são bastante semelhantes entre si e não existe nenhum grupo que se destaque. As amostras que não contêm edulcorantes são as que apresentam as maiores amplitudes de variação de LogCA.

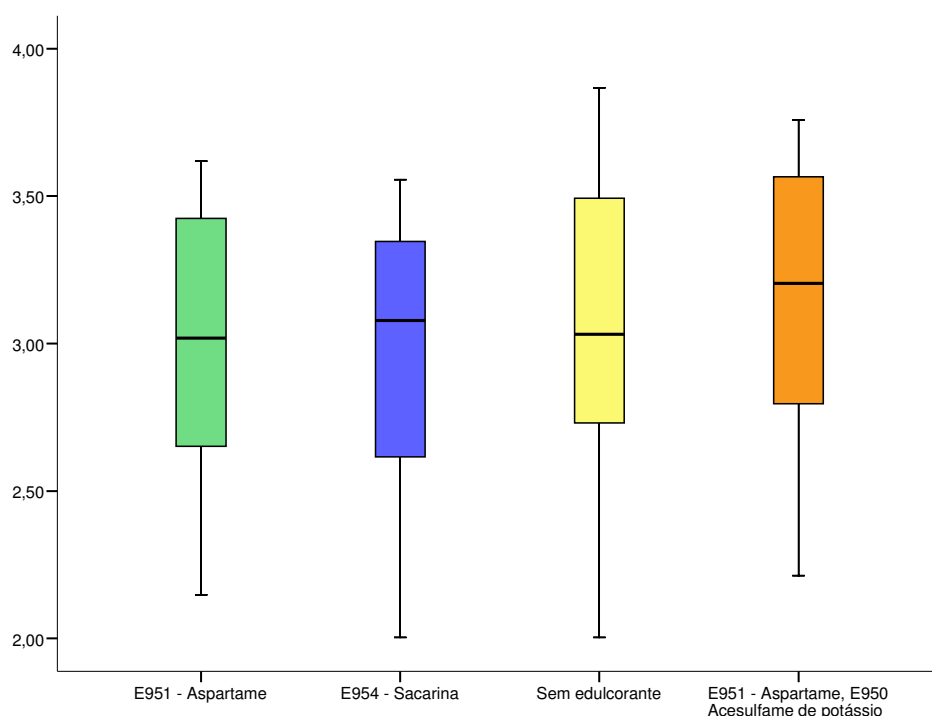


Figura 27 - Caixa de bigodes dos valores de LogCA, relativa aos edulcorantes para as bebidas refrigerantes.

As variâncias dos valores de CA dos vários edulcorantes não são consideradas estatisticamente diferentes entre si. O valor de significância do teste de *Levene* teve associado um nível de 0,101. O teste F indica um valor de significância de 0,340 o que nos permite concluir que não existem, grandes diferenças entre os diferentes edulcorantes. Esta conclusão pode ser verificada com os resultados dos testes *Post-Hoc* (ver Tabela 42-C, Anexo C).

### 3.3.1.6 Efeito dos reguladores de acidez

Os reguladores de acidez são substâncias que permitem acidificar ou tornar uma substância mais básica, tais como os ácidos ou bases derivados do malato e do citrato.

Os valores de CA encontrados foram muito dispersos, especialmente para o método TRAP aquando da associação E331 e E296 (citrato de sódio + ácido málico). Para as amostras sem regulador de acidez encontram-se as amostras 1 e 15 com valores aberrantes. A representação destes resultados em caixa de bigodes pode ser encontrada na Figura 20-C, Anexo C.

Foi necessário fazer a transformação dos valores de CA para logaritmo de CA visto que os valores experimentais não apresentavam uma distribuição de valores normal (valores de  $p$  para a maior parte das amostras iguais a 0,001). Depois da transformação fez-se a análise estatística dos resultados que está descrita na Tabela 43-C, Anexo C. Os valores médios de LogCA variam entre 2,98 e 3,47. Na Figura 28, está apresentada a caixa de bigodes para os valores de LogCA. O valor mínimo médio, 2,00 pertence ao grupo de amostras que na sua constituição não possuem reguladores de acidez e o máximo, 3,87, pertence ao regulador E296, ou ácido málico.

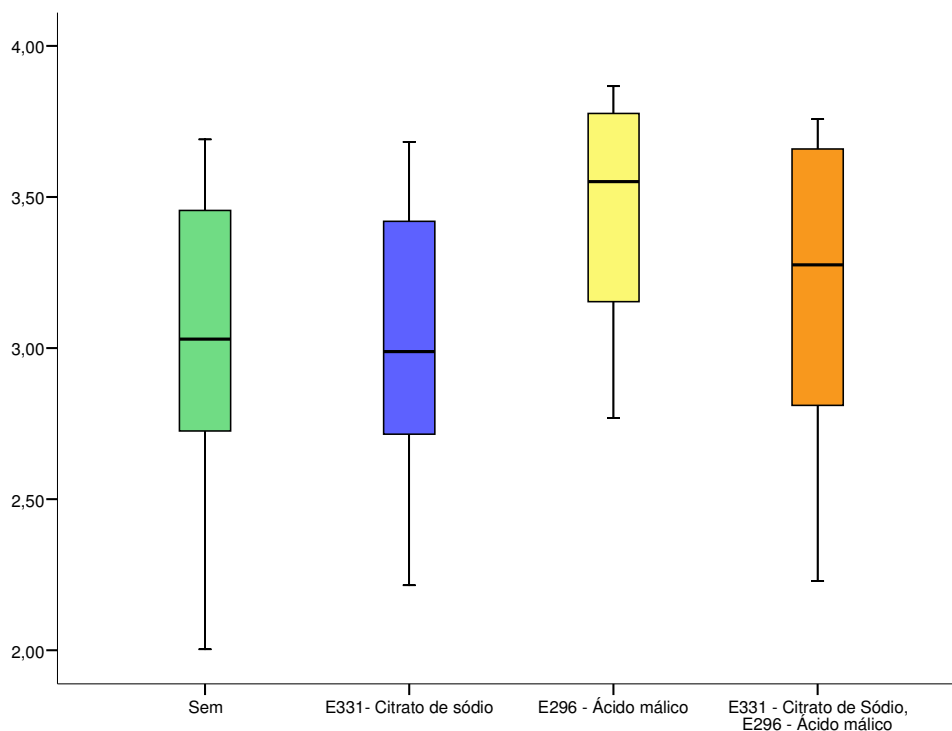


Figura 28 - Caixa de bigodes dos valores de LogCA, relativa aos reguladores de acidez para as bebidas refrigerantes.

O valor de  $p$  para LogCA varia entre 0,01 e 0,401, logo o pressuposto de normalidade é verificado pelo teste de *Shapiro-Wilk*. O pressuposto de homocedasticidade para LogCA também é verificado sendo o valor de  $p$  relativo ao teste de *Levene* de 0,625. No estudo Anova, utilizando o teste F, avalia-se a possibilidade de haver algum regulador de acidez que apresentasse o valor de LogCA diferente. Conclui-se, com um nível de significância de 0,015, que existe pelo menos um grupo diferente. Na Tabela 44-C, Anexo C, estão indicados para um *subset of alpha* de 0,01, dois subconjuntos homogêneos. Existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores de LogCA dos diferentes reguladores de acidez. As amostras que contêm ácido málico apresentam diferenças significativas das restantes amostras.

### 3.3.1.7 Efeito dos conservantes

As amostras analisadas contêm diferentes conservantes. Só as amostras da marca Frisumo não contêm qualquer conservante adicionado. Os conservantes presentes nas amostras de bebidas refrigerantes são o E202–Sorbato de potássio; o E223–Metassulfito de sódio; o E220–Dióxido de enxofre; e o E211–Benzoato de sódio. Os conservantes aparecem também em várias associações.

O valor médio de CA mais baixo pertence ao sorbato de potássio, 1653  $\mu\text{M}$  e o mais alto pertence à associação sorbato de potássio/benzoato de sódio com o valor de 1653  $\mu\text{M}$ . Esta associação é a que apresenta a maior amplitude de variação de valores de CA (consultar resultados na Tabela 45-C, Anexo C e na Figura 21-C, Anexo C).

O pressuposto de normalidade não é verificado para os valor de CA, sendo necessário proceder à transformação dos mesmos para logaritmo de CA. Na Figura 29 está representada a caixa de bigodes para os valores de LogCA. Segundo o teste de *Shapiro-Wilk*, os valores de significância para LogCA variam entre 0,023 e 0,713, logo verifica-se o pressuposto da normalidade. O teste de *Levene* teve associado um nível de significância de 0,151, garantindo o pressuposto de homocedasticidade.

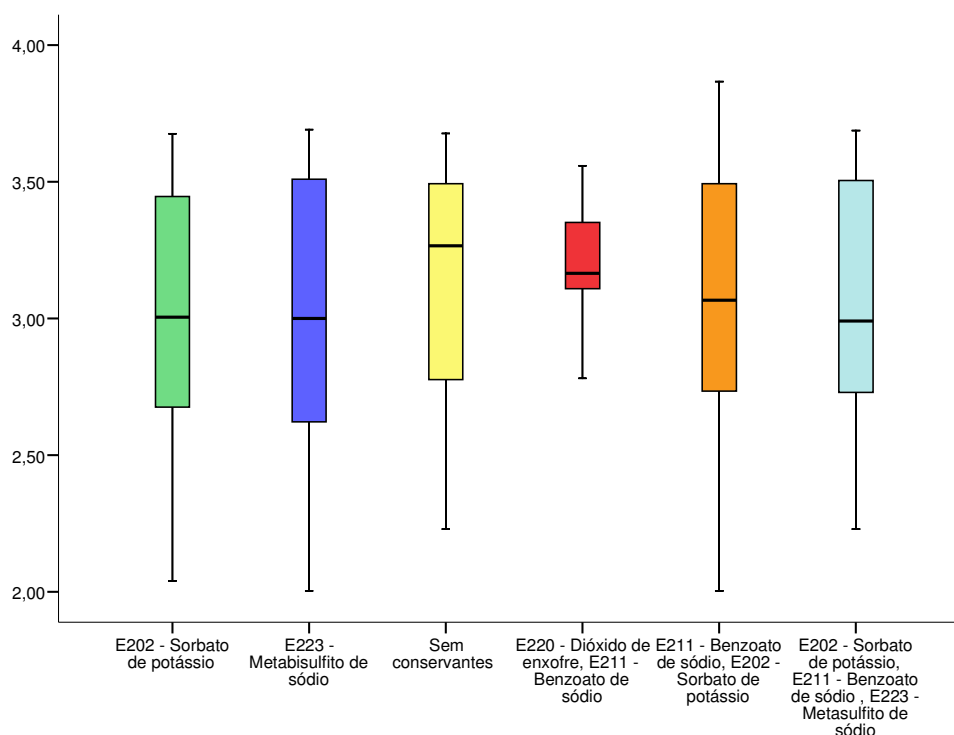


Figura 29 - Caixa de bigodes para os valores de LogCA, relativa aos conservantes para as bebidas refrigerantes.

Para avaliar se os valores de CA se poderiam considerar equivalentes para todos os grupos, recorre-se ao teste Anova com base no teste F. O resultado deste teste, indica um valor de significância de 0,949, podendo concluir-se que não existe um grupo distinto dos restantes. De acordo com o teste Anova, o agrupamento por conservantes só indicou num único grupo, como se pode confirmar pelos resultados expressos na Tabela 46-C, Anexo C.

### 3.3.1.8 Efeito dos estabilizantes

Existem vários estabilizantes diferentes que são utilizados nos refrigerantes. Os que se incluem nesta análise são o E414–Goma arábica; o E440–Pectina; o E445–Ester glicerol de “Wood Rosin” e o E410–Goma “Carob bean” e as várias associações entre si. Os valores médios variam entre 1270 e 2258  $\mu\text{M}$  (consultar Tabela 47-C, Anexo C). O valor mais elevado pertence ao grupo de amostras que não possuem estabilizantes na sua constituição, tal como o valor mais baixo, apresentando assim a maior amplitude de variação de CA (ver Figura 22-C, Anexo C). A média mais elevada é a da associação de pectina com goma “carob bean”. A maior dispersão de valores encontra-se nas amostras sem conservantes. A que apresenta maior dispersão é a associação E410/E414/E445.

O teste de *Shapiro-Wilk* não confirmou o pressuposto de normalidade pelo que se procedeu à transformação dos valores de CA para logaritmo de CA (Figura 30). Deste modo a normalidade é verificada, com os valores de  $p$  a variarem entre 0,01 e 0,859. O pressuposto de homocedasticidade é também verificado para um nível de significância de 0,341 através do teste de *Levene*.

Para se avaliar se os valores de CA se podem considerar equivalentes para todos os grupos recorre-se ao teste Anova. O teste F apresenta uma significância de 0,488 o que leva a concluir que os grupos são semelhantes. O teste Anova indica, por isso, um sub-conjunto homogéneo (ver Tabela 48-C, Anexo C).

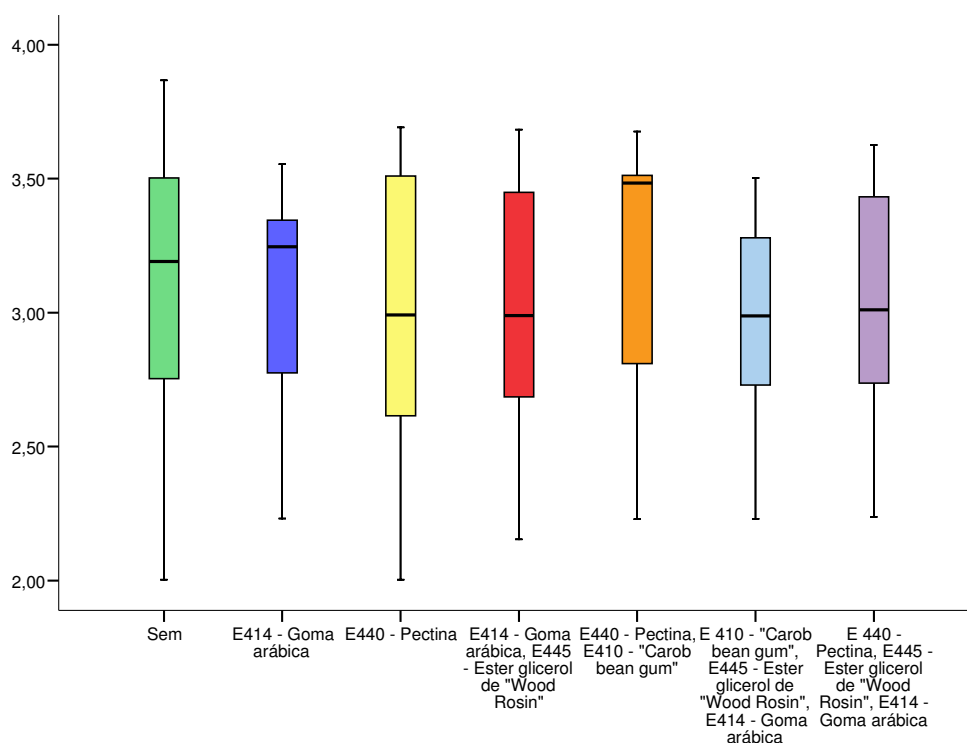


Figura 30 - Caixa de bigodes para os valores de LogCA, relativa aos estabilizantes para as bebidas refrigerantes.

### 3.3.1.9 Efeito das vitaminas

As vitaminas são um factor muito importante na determinação da CA, visto que elas são as substâncias naturais com maior CA. Todos os parâmetros estatísticos correspondentes a este agrupamento de resultados podem ser consultados na Tabela 49-C, Anexo C. Os valores médios dos dois grupos existentes são praticamente iguais, sendo a sua diferença de apenas 14  $\mu\text{M}$ . Por observação da Figura 31 verifica-se que as amostras 1, 5, 9 e 18 são observações aberrantes. As das amostras 1, 5 e 9 são severas e a da 18 é moderada. O método que apresenta os valores mais elevados de CA é o TEAC.

O pressuposto de normalidade não é verificado pois os valores de  $p$  são inferiores a 0,005 e é necessário recorrer à transformação dos valores de CA em Logaritmo, LogCA. Os valores de LogCA apresentam já normalidade, com significâncias de 0,01, o teste de *Levene* tem uma significância de 0,275. O teste Anova, com uma significância de 0,963, permite concluir que os grupos não apresentam diferenças substanciais.

Como só existem dois grupos de amostras não é possível efectuar os testes *Post-Hoc* visto que são necessários um mínimo de três grupos.



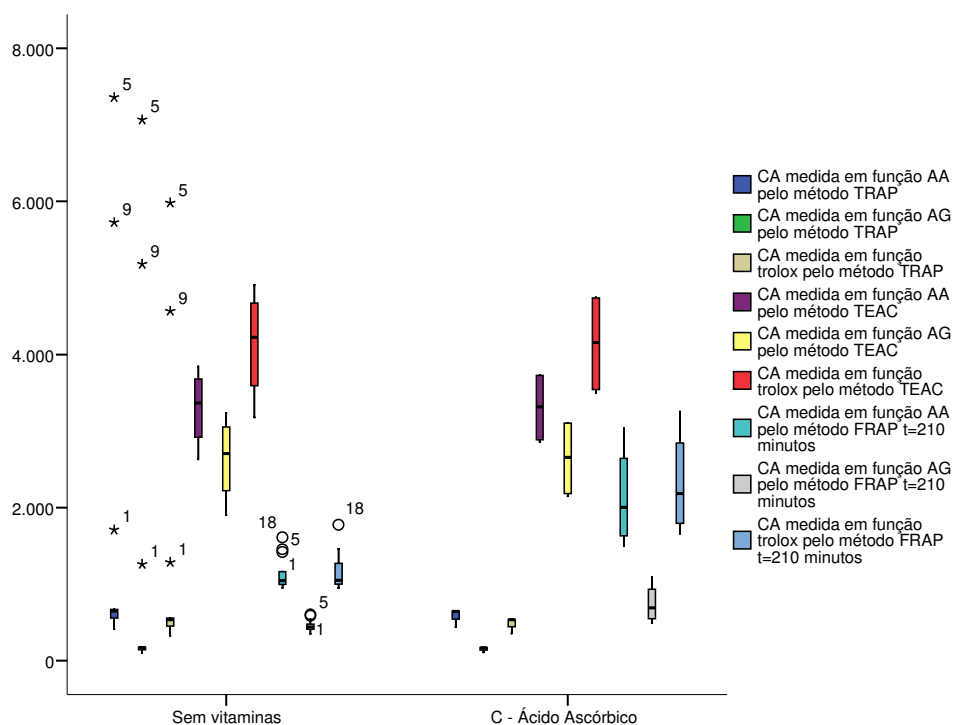


Figura 31 - Caixa de bigodes dos valores de CA, relativa às vitaminas para as bebidas refrigerantes.

### 3.3.1.10 Efeito do teor de sumo

O teor de sumo difere consoante o tipo de fruta que constituiu o refrigerante podendo contribuir para alterações ao nível das CA observadas. A Figura 32 representa a caixa de bigodes relativa ao teor de sumo que as bebidas refrigerantes possuem. O teor de sumo 14% refere-se a uma amostra isolada e por isso a caixa de bigodes é imperceptível para este teor. Os valores mais elevados e também mais dispersos são os valores para as amostras com teor de sumo de 16%. A grande maioria das amostras possuem valores de CA entre 2000 e 4000  $\mu\text{M}$ . Todos os parâmetros estatísticos correspondentes estão descritos na Tabela 50-C, Anexo C. Os valores médios estão compreendidos entre 1500 e 3004  $\mu\text{M}$ .

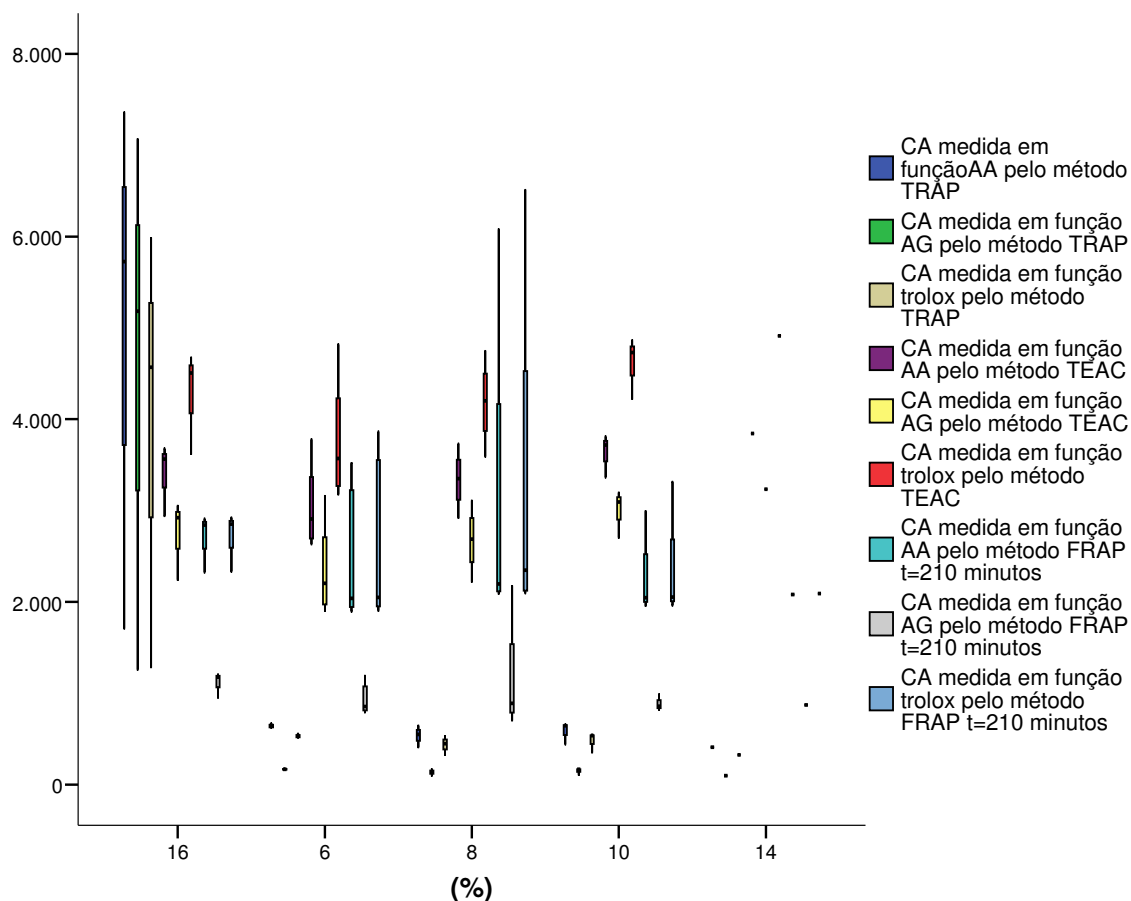


Figura 32 - Caixa de bigodes dos valores de CA, relativa ao teor de sumo para as bebidas refrigerantes.

Através do teste de *Shapiro-Wilk* o pressuposto de normalidade é verificado, sendo o valor mais baixo de significância igual a 0,091. O pressuposto da homocedasticidade também é verificado através do teste de *Levene*, sendo o seu valor de significância de 0,275. O teste Anova fornece-nos dois sub-conjuntos de médias para um *subset of alpha* =0,01. O sub-conjunto de 16% de teor de sumo é estatisticamente diferente dos restantes, apresentando os valores de CA mais elevados (ver Tabela 51-C, Anexo C).

### 3.3.1.11 Efeito da cor

A cor está directamente ligada ao teor de sumo. As amostras que apresentam a cor castanha são as amostras que contêm 16% de teor de sumo na bebida, as amostras amarelas são as que contêm 10% sumo, as de 6% são as amostras brancas e as de 8% são as cor de laranja. As amostras são de maçã, ananás, limão e laranja, respectivamente. Na Figura 33 apresenta-se a caixa de bigodes relativa à cor que a bebida apresenta. Ao comparar esta figura com a Figura 32, verifica-se algumas semelhanças. As amostras castanhas são as que apresentam os valores mais elevados e os mais dispersos. O método TEAC é o que apresenta maior regularidade pois para todas as amostras os valores de CA estão compreendidos entre 2000 e 5000  $\mu\text{M}$ . Na Tabela 52-C, Anexo C, estão descritos todos os parâmetros estatísticos relativos às cores das amostras. Estes valores são muito semelhantes aos parâmetros relativos ao teor de sumo na amostra. O pressuposto de normalidade é verificado pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Os valores de p variam entre 0,035 e 0,984. Quanto ao valor de significância do teste de *Levene*, este verifica a homocedasticidade, com um valor de 0,029.

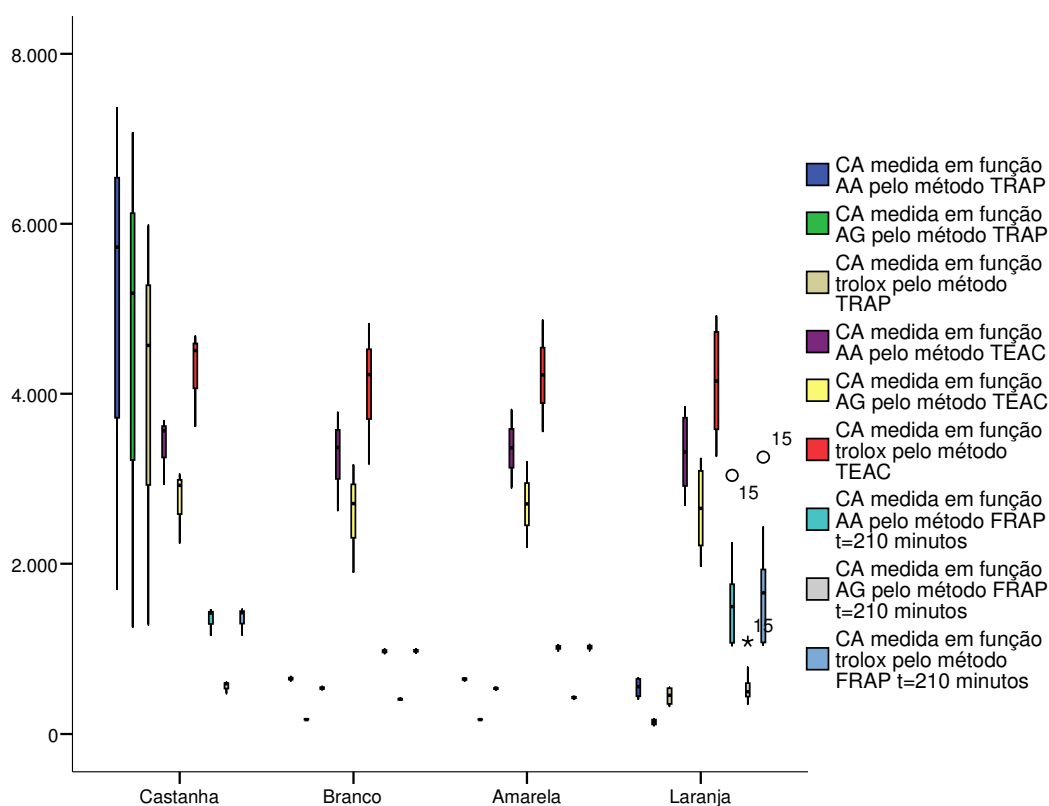


Figura 33 - Caixa de bigodes dos valores de CA, relativa à cor para as bebidas refrigerantes.

Recorre-se ao teste Anova para analisar as médias e verificou-se que o teste de F teve um valor de  $p=0,000$ , que nos dá a informação de que existe pelo menos um grupo de amostras que é estatisticamente diferente dos outros. Os resultados indicam dois subconjuntos homogêneos de médias, em que as amostras castanhas são estatisticamente diferentes das restantes e apresentam os valores de CA mais elevados. (ver Tabela 53-C, Anexo C).

### 3.3.1.12 Efeito do método

Estudar o efeito do método é importante visto que, os resultados obtidos em cada método são distintos para a mesma amostra. O efeito do método é analisado segundo o padrão utilizado. Assim apresenta-se de seguida o efeito do método no padrão de AA, seguidamente no padrão AG e depois no Trolox. Para o efeito do método em função de AA, foi necessário transformar os valores de CA para que estes assegurassem a normalidade e homocedasticidade, a transformação em logaritmo não foi eficaz, tendo-se optado pela transformação dos valores de CA em seno,  $\text{senCA}$ , ver ponto 3.3 na página 39.

Pelo teste de *Shapiro-Wilk*, testa-se a normalidade para os valores de  $\text{senCA}$ . O pressuposto de normalidade é aqui verificado com valores de significância de 0,01. Na Figura 34 encontra-se a caixa de bigodes relativa ao efeito do método para o padrão de AA. Verifica-se que o método TEAC apresenta o valor médio mais baixo para valores de  $\text{senCA}$ , enquanto que o FRAP apresenta o valor mais alto.

Os parâmetros estatísticos relativos ao efeito do método para o padrão AA encontram-se na Tabela 54-C, Anexo C.

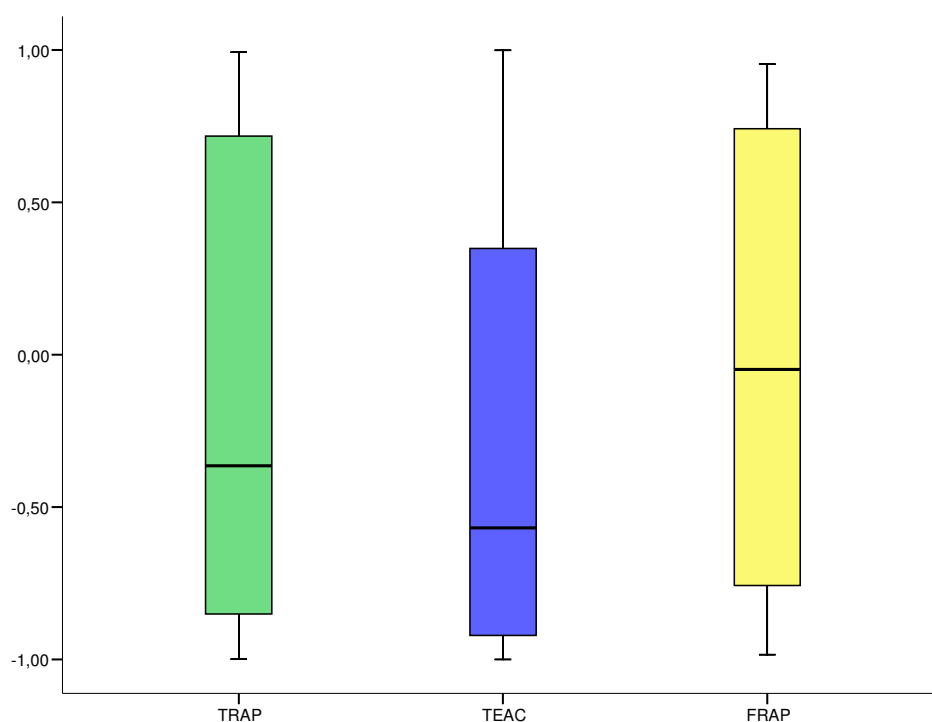


Figura 34 - Caixa de bigodes para os valores de senCA, relativa ao efeito do método para o padrão de AA, para as bebidas refrigerantes.

A homocedasticidade é verificada segundo o teste de *Levene* com uma significância de 0,033. O teste F do Anova indica um valor de  $p$  de 0,819 o que pressupõe que não exista diferenças consideráveis, ao nível estatístico.

Na Tabela 55-C, Anexo C encontra-se o sub-conjunto homogêneo encontrado para um *subset of alpha* de 0,01. Como todos os grupos se encontram no mesmo sub-conjunto, podemos concluir que os métodos não apresentam diferenças significativas entre si.

Relativamente ao efeito do método, e para o padrão AG, os valores de CA verificam os pressuposto de normalidade e homocedasticidade. Os valores de  $p$  foram 0,01 e 0,114 para os testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene*, respectivamente. Todos os parâmetros estatísticos se encontram na Tabela 56-C, Anexo C.

Por análise da Figura 35, a caixa de bigodes relativa ao efeito do método em função do padrão AG, apuramos que o método FRAP parece muito distinto do método TEAC, visto que o valor mínimo de FRAP é praticamente igual ao valor máximo de TEAC.

O valor médio de senCA mais elevado é para o método FRAP, 4134  $\mu\text{M}$ , e o mais baixo é para o TEAC, 2638  $\mu\text{M}$ . A amplitude de valores para o TRAP varia entre 2632 e 3845  $\mu\text{M}$ . O teste Anova permite averiguar a semelhança entre estes 3 grupos.

O teste F indica um valor de  $p=0,000$ , o que indica que pelo menos um grupo é estatisticamente diferente dos restantes. O teste Anova fornece três sub-conjuntos homogêneos para um intervalo de confiança de 99% indicando que os três métodos têm diferenças estatisticamente significativas entre si (ver Tabela 57-C, Anexo C).

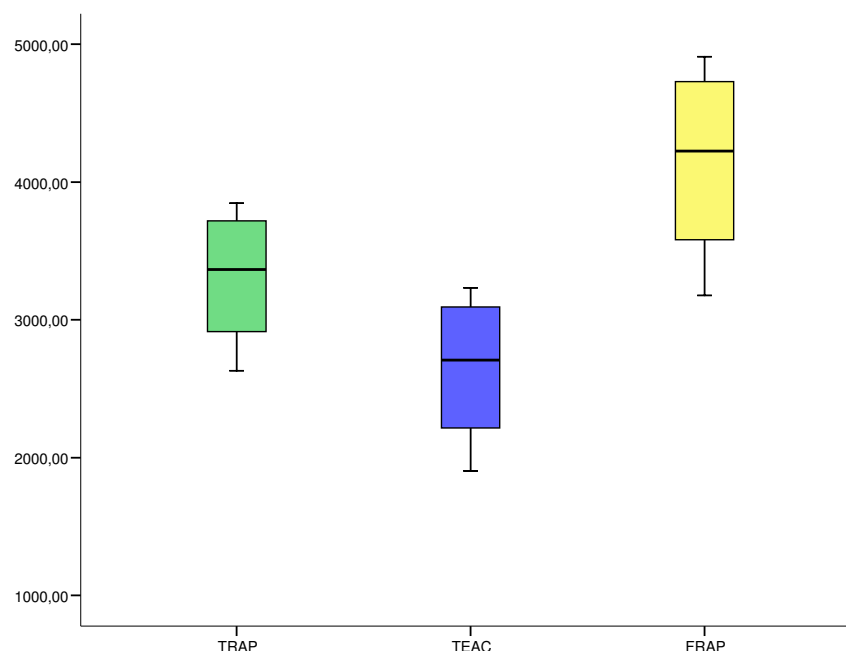


Figura 35 - Caixa de bigodes para os valores de senCA, relativa ao efeito do método para o padrão de AG, para as bebidas refrigerantes.

Para o padrão Trolox a análise é semelhante à do efeito do método para o padrão AA, os valores de CA são transformados em senCA e posteriormente verifica-se se estes valores obedecem aos pressupostos de normalidade e de homocedasticidade. O teste de *Shapiro-Wilk* indicou uma significância com valores compreendidos entre 0,01 e 0,16. O teste de *Levene* teve um valor de  $p=0,481$ . Na caixa de bigodes representada na Figura 36, podem comparar-se os valores de senCA para os três métodos em função do Trolox. Verificamos que o método TRAP e FRAP apresentam uma distribuição de valores semelhante enquanto que o TEAC, apesar de os seus valores mínimo e máximo serem próximos dos outros dois métodos, os valores do 1º quartil são mais elevados e os valores do 3º quartil são mais baixos. Todos os parâmetros estatísticos dos valores de senCA encontram-se na Tabela 58-C, Anexo C.

O teste Anova permite aferir sobre a igualdade ou desigualdade dos diferentes métodos. O teste F indicou um valor de  $p=0,470$ , o que nos permite concluir que só existe um sub-conjunto homogêneo de médias onde se inclui os três métodos (ver Tabela 59-C, Anexo C).

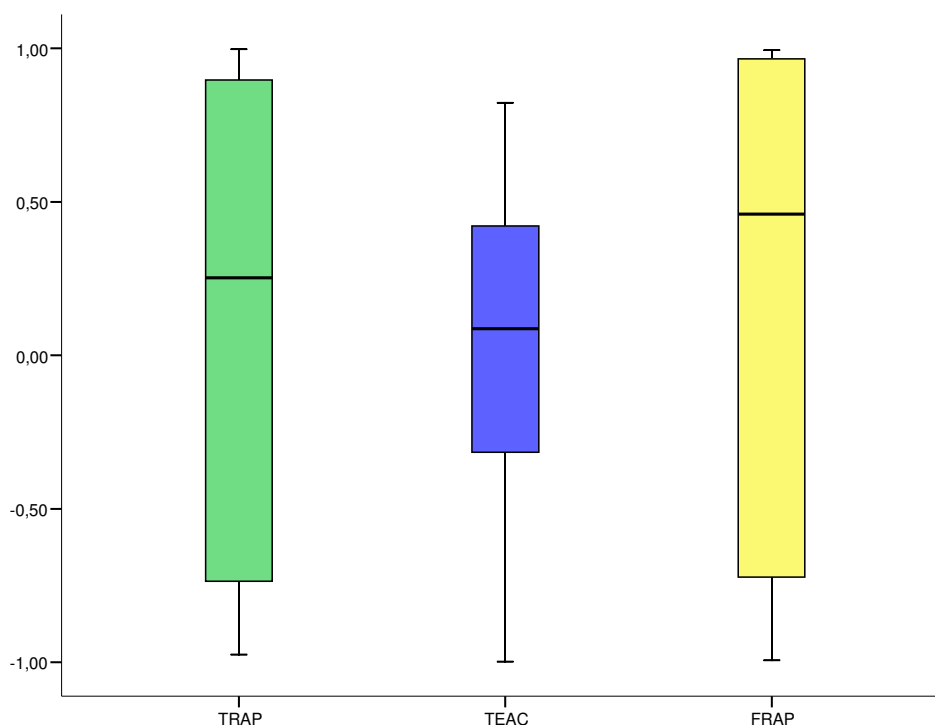


Figura 36 - Caixa de bigodes para os valores de senCA, relativa ao efeito do método para o padrão de Trolox, para as bebidas refrigerantes.

### 3.3.1.13 Efeito do padrão

Deve ser analisado o efeito do padrão nos valores de CA visto que na observação dos resultados obtidos se verificou que estes não são homogêneos em todos os padrões. Nesta análise os padrões são agrupados por métodos, ou seja, o efeito do padrão é analisado em função do método TRAP, TEAC e FRAP.

Relativamente ao efeito do padrão pelo método TRAP, para que os pressupostos de normalidade e homocedasticidade sejam verificados é necessário transformar os valores de CA em senCA, ver ponto 3.3 na página 39. Os valores de  $p$  segundo o teste de *Shapiro-Wilk* e de *Levene* apresentam, assim, uma significância de 0,01 e 0,51, respectivamente. Na Tabela 60-C, Anexo C, encontram-se todos os parâmetros estatísticos relativos ao efeito do padrão em função do método TRAP.

A Figura 37 apresenta a caixa de bigodes para o estudo do efeito do padrão em função do método TRAP. Os valores médios variam de -0,11 para o Trolox a 0,15 para o AA. A dispersão dos valores de senCA é semelhante nos três padrões.

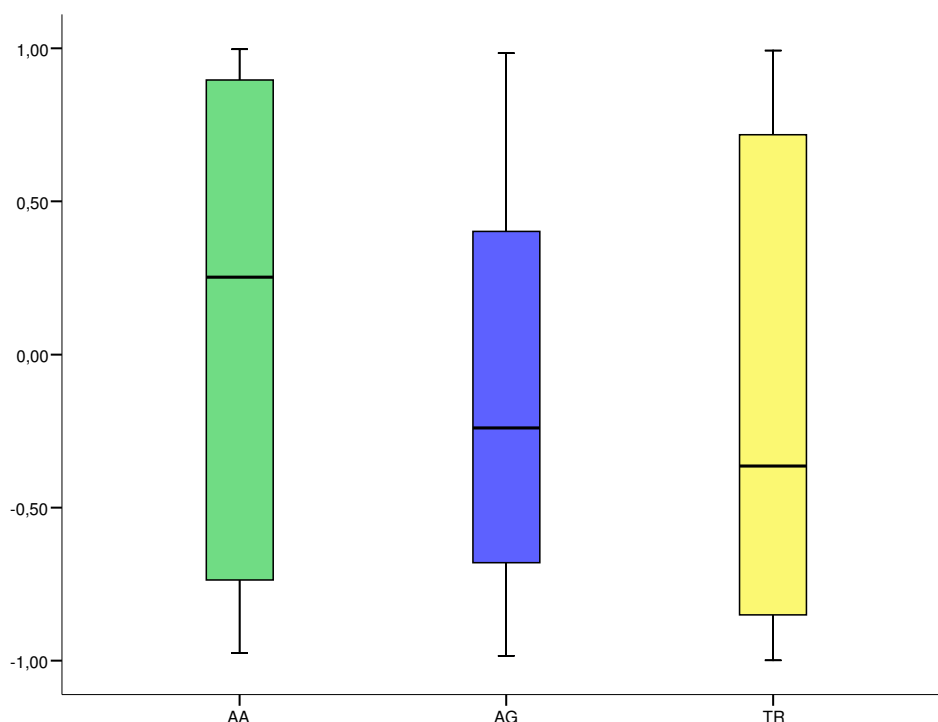


Figura 37 - Caixa de bigodes para os valores de senCA, relativa ao efeito do padrão para o método TRAP, para as bebidas refrigerantes.

O teste Anova permite estudar se alguns dos padrões apresentam diferenças significativas dos restantes. O teste F origina uma significância de 0,449 (ver Tabela 61-C, Anexo C). Consequentemente, o teste Anova indica sub-conjunto onde todos os padrões são agrupados, ou seja, não existem diferenças estatisticamente significativas entre os padrões.

A análise do efeito do padrão para o método TEAC é semelhante à anterior. Os valores de CA são também transformados em senCA, para que os pressupostos de normalidade e homocedasticidade sejam verificados. O teste de normalidade da variável transformada origina valores de significância entre 0,01 e 0,16. Pela análise da caixa de bigodes posteriormente indicada, Figura 38, e da Tabela 62-C, Anexo C, é possível comparar os três padrões. O valor médio máximo pertence ao padrão AA, com o valor de 0,15, e o valor mais baixo ao Trolox (-0,01).

No estudo Anova pretende-se saber se os valores médios de senCA são iguais para qualquer padrão, utilizando-se para isso o teste F. O valor de significância deste teste foi de 0,192. Como o teste apresenta um valor superior a 0,01 pode concluir-se que nenhum dos grupos é significativamente diferente dos outros. Para um *subset of alpha* =0,01 o teste Anova fornece apenas um sub-conjunto (Tabela 63-C, Anexo C).



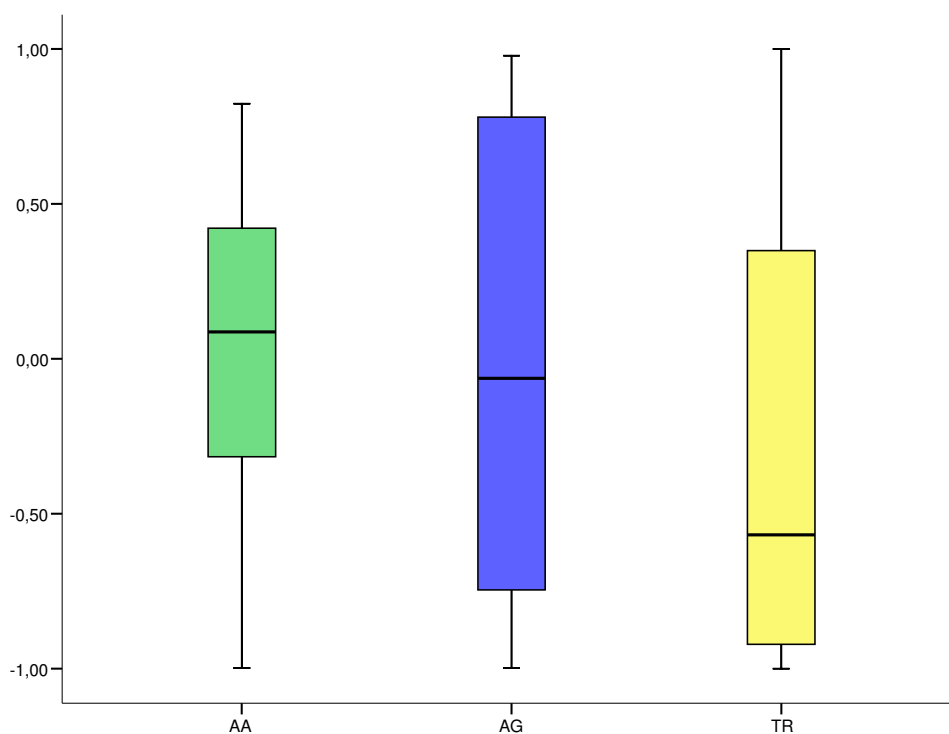


Figura 38 - Caixa de bigodes para os valores de senCA, relativa ao efeito do padrão para o método TEAC, para as bebidas refrigerantes.

Finalmente, é efectuada a análise do efeito do padrão em função de FRAP. Tal como nas análises anteriores do efeito do padrão foi necessária a transformação dos valores de CA para senCA para garantir a normalidade. Na tabela 64, Anexo C, encontram-se descritos os valores estatísticos para o estudo deste efeito. Na Figura 39, apresenta-se a caixa de bigodes relativa ao efeito do método para o método FRAP. O valor médio mais elevado pertence ao padrão AA e o mais baixo ao Trolox. O valor mínimo é de -1,00 para todos os padrões e o máximo é de 1 para o Trolox.

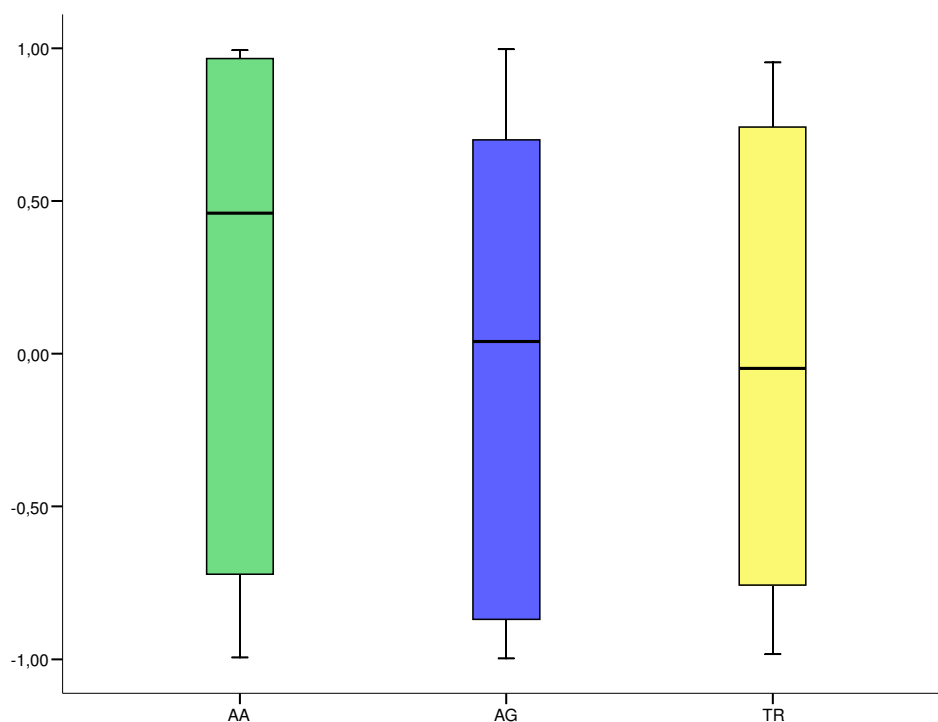


Figura 39 - Caixa de bigodes para os valores de senCA, relativa ao efeito do padrão para o método FRAP, para as bebidas refrigerantes.

Neste sentido, é possível averiguar pelo teste Anova, se existe algum padrão que apresente diferenças estatisticamente diferentes dos outros. O pressuposto de homocedasticidade é válido pelo teste de *Levene*, obteve-se um valor de  $p=0,542$ .

O teste F apresenta um valor de significância de 0,80, pelo que o Anova fornece um sub-conjunto homogêneo, para um intervalo de confiança de 99% (Tabela 65-C, Anexo C).

### 3.3.2 Vinho

Para as amostras de vinho, os factores considerados neste estudo são a presença de gás, o teor de álcool, o tipo de vinho e o efeito do método e do padrão utilizado na análise.

#### 3.3.2.1 Efeito do tipo de vinho (Denominação)

Os vinhos aqui estudados dividem-se em vinhos verdes e vinhos maduros. Para os vários métodos estudados, registam-se valores de CA muito distintos. A caixa de bigodes correspondente pode ser consultada na Figura 23-D, Anexo D. O método que apresenta os valores de CA mais elevados é o TEAC, sendo os seus valores mínimos mais elevados do que os valores máximos de CA para os outros métodos. Os seus valores médios variam entre 13661 e 21285  $\mu\text{M}$ . O método que apresenta os valores mais baixos de CA é o FRAP, com valores médios compreendidos entre 214 e 749  $\mu\text{M}$ . Para facilitar a visualização e a comparação entre os métodos apresenta-se na Figura 40 uma caixa de bigodes onde os valores de FRAP foram multiplicados por 10. Genericamente, os vinhos maduros apresentam amplitudes inter-quartis maiores do que os vinhos verdes e, dentro dos vinhos maduros, são os métodos TEAC e TRAP onde se verificam as maiores amplitudes.

Para todos os métodos e para todos os padrões verifica-se o pressuposto da normalidade ( $p > 0,01$ ), com valores compreendidos entre 0,125 para o método TEAC, sendo igual para todos os padrões, e 0,968 para o método TRAP com o AG. A homocedasticidade é verificada por um valor de  $p$  igual a 0,892 no teste de *Levene*.

Os valores estatísticos relativos à comparação dos diferentes tipos de vinho encontram-se descritos na Tabela 66-D, Anexos D. Os valores médios entre os diferentes tipos de vinho são muito próximos, mas verifica-se que os vinhos verdes apresentam valores de CA mais elevados, sendo o valor médio de 8195  $\mu\text{M}$ .

No estudo Anova o teste F apresenta um valor de significância de 0,722, o que significa que os dois grupos apresentam valores de CA semelhantes. Não existem, assim, diferenças significativas entre os diferentes tipos de vinho. Como só existem dois tipos diferentes de vinhos não é possível efectuar os testes Post-Hoc, sendo necessário o mínimo de 3 grupos para efectuar essa análise.

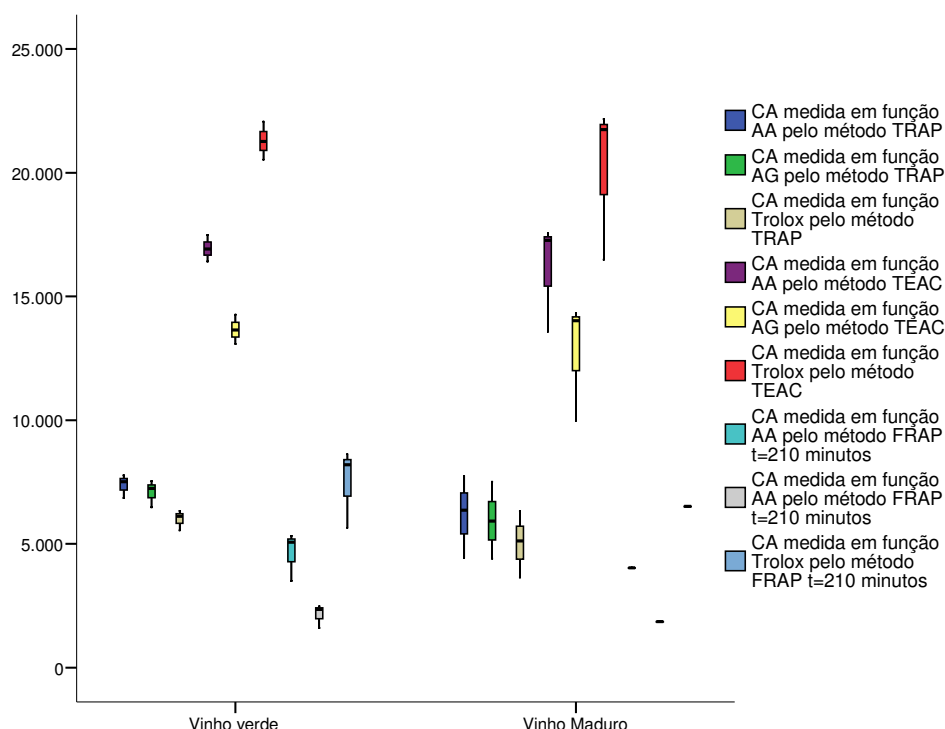


Figura 40 – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos à denominação para os vinhos.

### 3.3.2.2 Efeito da presença de gás

A análise da presença de gás é muito semelhante à análise anterior visto que os vinhos verdes são os que apresentam gás e os vinhos maduros são os que não apresentam gás na sua constituição. Na Figura 24-D, Anexo D, encontra-se a caixa de bigodes com os valores de CA experimentais. Mais uma vez, para facilitar a visualização e a comparação entre os métodos, apresenta-se na Figura 41 uma caixa de bigodes onde os valores de FRAP foram multiplicados por 10.

Relativamente ao teste de normalidade para a presença de gás, todos os métodos e todos os padrões verificam o pressuposto da normalidade ( $p > 0,01$ ), com valores compreendidos entre 0,125 para o método TEAC, sendo igual para todos os padrões e 0,968 para o método TRAP com o AG. Na análise da homogeneidade de variâncias entre os grupos, com e sem gás, as variâncias de CA das várias amostras são considerados estatisticamente semelhantes com um valor de significância de 0,892, tal como na análise anterior dos diferentes tipos de vinho.

Os valores de estatística descritiva dos grupos com e sem gás encontram-se descritos na Tabela 67-D, Anexos D. As médias encontradas são muito semelhantes entre si. O estudo Anova sugere a existência de um único sub-conjunto de médias, para um valor de  $p$  superior a 0,01. Não foram, por isso, encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os vinhos com e sem gás.

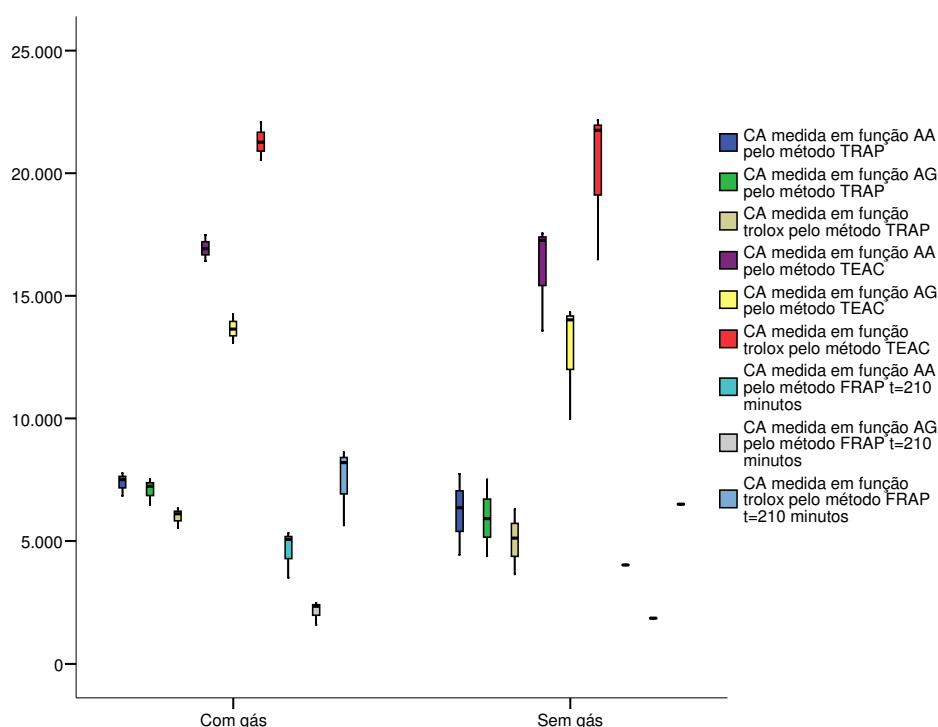


Figura 41 – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos à presença de gás para os vinhos.

### 3.3.2.3 Efeito do teor de álcool

Os teores de álcool que as amostras de vinho possuem são 9, 10 e 13%. A análise do teor de álcool é também muito semelhante às análises anteriores porque os vinhos que apresentam o teor de 9% são os vinhos verdes e os que apresentam gás na sua constituição enquanto que os vinhos maduros, que não contêm gás, contêm o teor mais elevado de álcool, 13%. Na Figura 25-D, Anexo D, encontra-se a caixa de bigodes original. Para facilitar a visualização e a comparação entre os métodos, os valores do método FRAP são mais uma vez, multiplicados por 10, e o teor de 10% de álcool, um valor único, é retirado. Na Figura 42 representa-se a caixa de bigodes sem os valores da CA para o teor de 10% de álcool e com os novos valores para o método FRAP. O teor de álcool de 13% apresenta a maior amplitude de variação de CA e o método FRAP os valores mais reduzidos de CA.

Para todos os métodos e para todos os padrões verifica-se o pressuposto da normalidade ( $p > 0,01$ ) com valores compreendidos entre 0,125 para o método TEAC, sendo igual para todos os padrões, e 0,968 para o método TRAP com o AG. Verifica-se o pressuposto da homocedasticidade que foi obtida através do teste de Levene, com um valor de significância de 0,957.

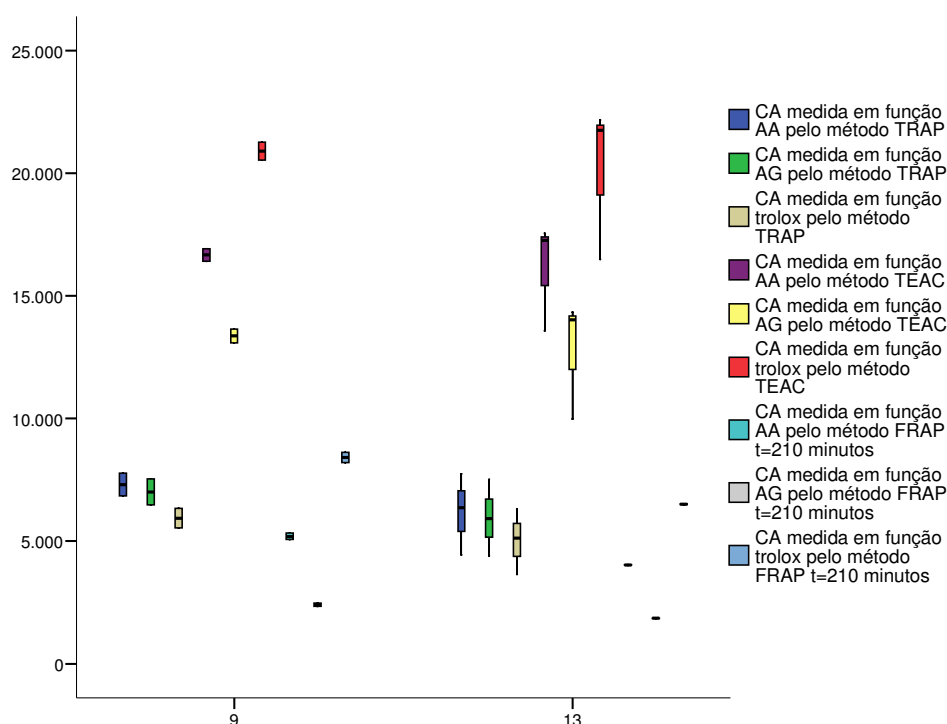


Figura 42 – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos ao teor de álcool, para os vinhos.

Os valores estatísticos relativos ao teor de álcool nas várias amostras de vinho podem ser consultados na Tabela 68-D, Anexo D. O valor mais baixo de CA revela-se para as amostras que têm um teor de álcool mais elevado. O teor para o qual o valor de CA é mais elevado é o de 10%, que corresponde à amostra n.º 20. De uma forma geral, as amplitudes entre os valores mínimo e máximo são bastante elevadas.

No estudo Anova o teste F apresenta uma significância de 0,933, o que significa que os dois grupos apresentam valores de CA semelhantes. Não existem assim diferenças significativas entre os vinhos com diferentes teores de álcool. Neste sentido, para um intervalo de confiança de 99%, *subset of alpha*=0,01, o teste Anova fornece um único subconjunto homogêneo de médias (ver na Tabela 69-D, Anexo D).

### 3.3.2.4 Efeito do método

É importante analisar o efeito do método pois os resultados obtidos são muito diferentes para as mesmas amostras. Na Figura 43 representa-se a caixa de bigodes relativa ao efeito do método para as amostras de vinho. O método que apresenta a maior amplitude de valores é o método FRAP e o que apresenta o menor valor é o TEAC. Verifica-se que a mediana é mais baixa para o FRAP.

Na comparação dos valores médios dos três métodos (Tabela 70-D, Anexo D) identifica-se o valor mínimo que pertence ao método TEAC e o valor máximo que pertence ao método FRAP, sendo respectivamente, 160 e 22160  $\mu\text{M}$ . Relativamente ao teste de normalidade realizado através do teste de *Shapiro-Wilk*, não se verifica o pressuposto da normalidade ( $p > 0,01$ ) para todos os métodos, nomeadamente para o método FRAP, sendo o valor de  $p = 0,000889$ . Como o número de amostras observadas para cada método é igual, a não normalidade tem consequências mínimas na interpretação dos resultados e não foi necessária a transformação dos valores de CA. A homocedasticidade é verificada através do teste de *Levene*. As variâncias dos valores de CA dos vários métodos são considerados estatisticamente semelhantes, já que o valor de significância é de 0,023.

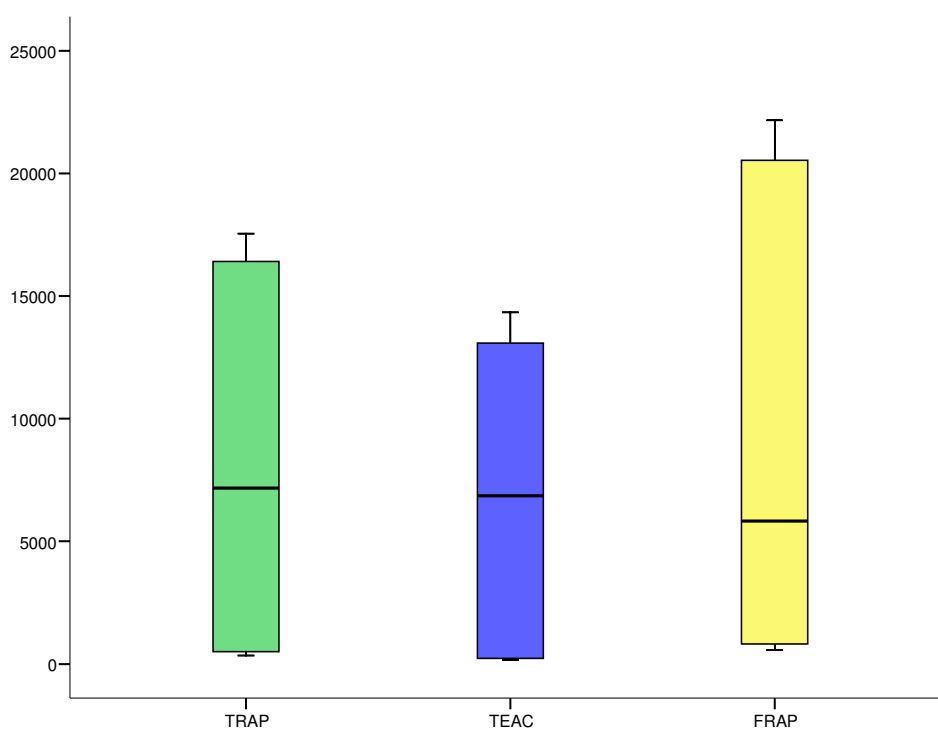


Figura 43 – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos efeito do método, para os vinhos.

Como o teste F apresenta um valor de significância de 0,630, pode concluir-se que os grupos são semelhantes entre si. O teste Anova sugere, por isso, um subconjunto homogêneo de médias (ver Tabela 71-D, Anexo D).

### 3.3.2.5 Efeito do padrão

O efeito do padrão também deve ser analisado visto que os resultados de CA obtidos diferem de padrão para padrão. A Figura 44 mostra a caixa de bigodes relativa às amostras de vinho agrupadas por padrão. Observa-se que os valores médios são muito diferentes entre si, sendo para o padrão de AG de 16818  $\mu\text{M}$ , para o Trolox de 444  $\mu\text{M}$  e para o TRAP 6267  $\mu\text{M}$ . O AG é o padrão que apresenta a maior amplitude de valores, variando de 9976 a 22160  $\mu\text{M}$ . O Trolox é o que apresenta a menor amplitude com uma variação de 702  $\mu\text{M}$  (ver Tabela 72-D, Anexo D). Relativamente à normalidade, verifica-se pelo teste de *Shapiro-Wilk* que este pressuposto se verifica para todos os padrões e a sua significância varia de 0,152 para o AA a 0,228 para o AG. O teste de *Levene* tem uma significância inferior a 0,005, mas como o número de amostras em cada grupo é igual, este pressuposto pode ser violado de acordo com *Everitt e Brian* [20]. *Everitt e Brian*, em 1996 tomaram a seguinte consideração, se o número de observações para cada conjunto de amostras for igual ou semelhante a verificação da homocedasticidade pode ser violado e a análise do teste F pode ser efectuada. O teste F apresenta uma significância de 0,000 o que leva a concluir que existe pelo menos um grupo com valores de CA diferentes dos restantes. O teste Anova sugere três *subset of alpha*=0,01 indicando que cada padrão fornece resultados estatisticamente diferentes dos restantes (ver Tabela 73-D, Anexo D).

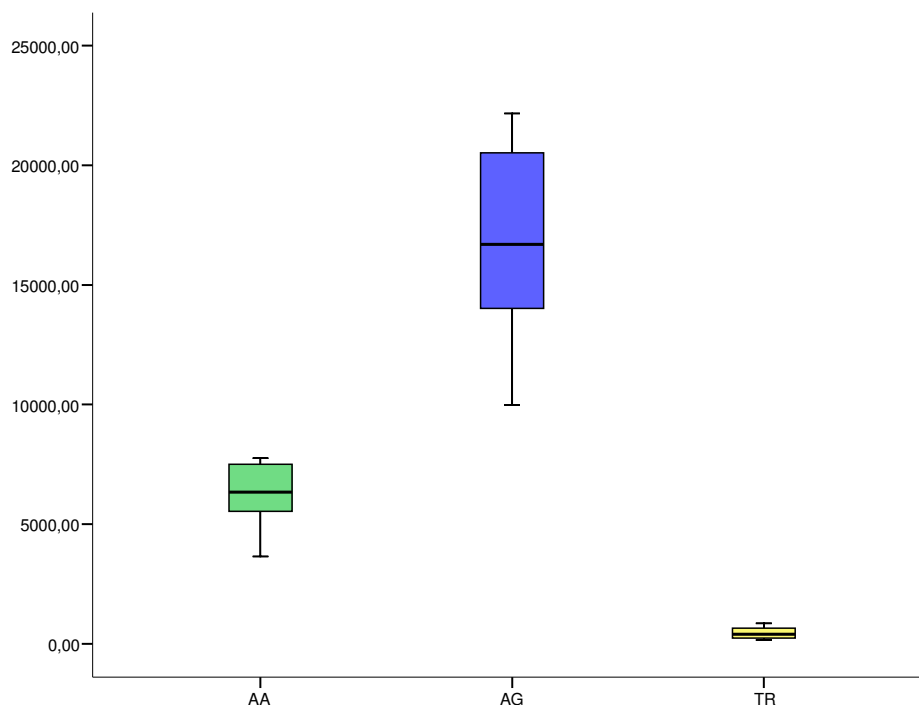


Figura 44 – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos efeito do padrão, para os vinhos.



### 3.3.3 Águas

As águas aromatizadas contêm aromas de frutos que parecem ser determinantes nos valores de CA. As águas naturais não contêm aromas nem qualquer aditivo e funcionam como controlo neste estudo. Os factores tidos em conta nesta análise são, a marca comercial, os aromas, os edulcorantes, os reguladores de acidez, os conservantes, as vitaminas, os antioxidantes, os métodos e os padrões.

#### 3.3.3.1 Efeito da marca comercial

Este estudo considera três marcas comerciais diferentes: Luso, Vitalis e Jana. Por questões de natureza comercial as marcas serão omitidas desta discussão, e substituídas por incógnitas. Os parâmetros estatísticos relativos à marca comercial estão descritos na Tabela 74-E, Anexo E. Os valores médios variam entre 220 e 629  $\mu\text{M}$ . O valor mínimo é zero, que se verifica para as águas naturais, e o valor máximo é de 1737  $\mu\text{M}$ . Na Figura 45 encontra-se a caixa de bigodes relativa à marca comercial. Verifica-se que a marca C apresenta os maiores valores e mais dispersos de CA para o método FRAP, nos padrões de AA e TR.

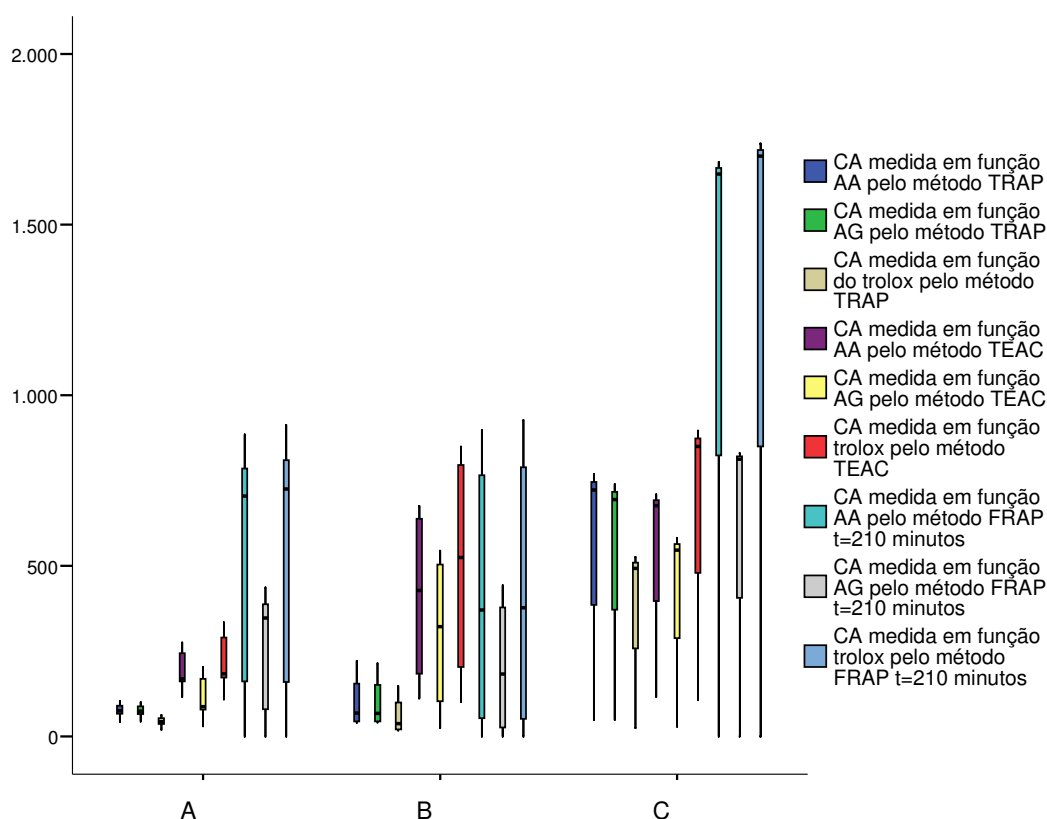


Figura 45 – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos à marca comercial, para as águas.

Os valores mais baixos são para a marca A, no método TRAP. Genericamente o método FRAP é o que apresenta os maiores valores de CA para todas as marcas.

Os pressupostos de normalidade e de homocedasticidade são verificados pelos teste de *Shapiro-Wilk* e *Levene*, com valores de significância entre 0,035 e 0,930 para o teste de normalidade e de 0,01 no teste de homogeneidade de variâncias.

Recorre-se ao teste Anova para verificar se alguma das marcas apresenta diferenças significativas em relação às restantes. O teste F decorrente indica uma significância de 0,000. Este resultado propõe que pelo menos um dos grupos é significativamente diferente dos outros. O teste Anova identifica dois sub-conjuntos homogêneos de médias onde se verifica que a marca C apresenta diferenças estatisticamente diferentes das outras duas e os valores de CA médio elevados (ver Tabela 75-E, Anexo E).

### 3.3.3.2 Efeito dos aromas

Os aromas são um factor importante relativamente à CA pois os frutos contêm muitas substâncias com propriedades antioxidantes. Os valores médios agrupados de acordo com este factor variam entre 40 e 553  $\mu\text{M}$  (ver tabela 76-D, Anexo E). O valor mínimo, 0  $\mu\text{M}$ , é para as águas naturais, e o máximo, 1737  $\mu\text{M}$  é para o aroma de morango. Na Figura 26-E, Anexo E, encontra-se a caixa de bigodes relativa aos valores experimentais de CA. De seguida apresenta-se uma caixa de bigodes só com os aromas de morango e limão visto que todos os outros aromas são amostras únicas e não permitem a fácil interpretação dos resultados (ver Figura 46). Na generalidade os valores de CA variam na gama de 0 a 1000  $\mu\text{M}$ , sendo que para o método FRAP, padrões AA e Trolox existem valores superiores a 1000  $\mu\text{M}$ .

Relativamente ao teste de normalidade realizado através do teste de *Shapiro-Wilk*, verifica-se o pressuposto da normalidade ( $p > 0,01$ ) para todos os métodos, com os valores de  $p$  a variar entre 0,032 e 0,377. A verificação da homocedasticidade é realizada através do teste de *Levene*. As variâncias dos valores de CA dos vários métodos são considerados estatisticamente semelhantes, com o valor de significância igual a 0,01. Como o teste F apresenta um valor de significância de 0,024, pode concluir-se que os grupos são semelhantes entre si. O teste Anova sugere, por isso, um sub-conjunto homogêneo de médias (ver Tabela 77-E, Anexo E).

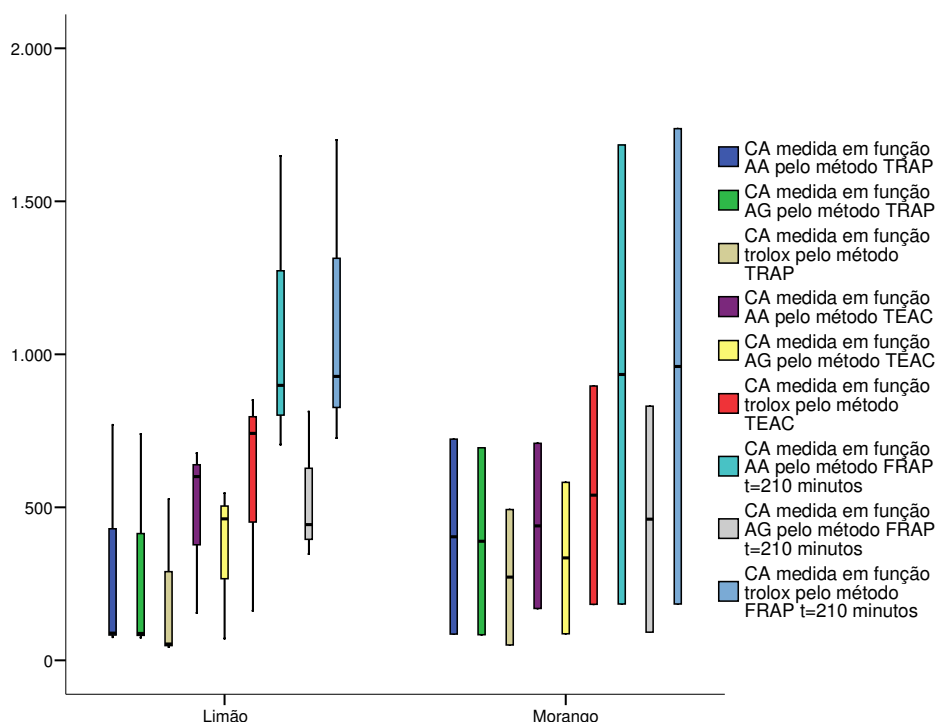


Figura 46 – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos aos aromas de morango e limão, para as águas

### 3.3.3.3 Efeito dos edulcorantes

O único edulcorante presente nas águas aromatizadas é o E950-Acesulfame de potássio. Só a marca A utiliza este edulcorante. A caixa de bigodes relativa aos edulcorantes encontra-se na Figura 47. Verifica-se que a amostra n.º 11 é uma observação aberrante severa. Os valores de CA para o método FRAP, padrões AA e Trolox, apresentam os valores mais elevados, quer para as amostras sem edulcorante, como para as que contêm edulcorante. Todos os parâmetros estatísticos encontram-se na Tabela 78-E, Anexos E. Os valores de CA para as amostras sem edulcorantes variam entre 0 e 1737  $\mu\text{M}$ , os valores das amostras que contêm o E950 variam entre 36 e 913  $\mu\text{M}$ . O valor médio mais elevado é para as amostras sem edulcorante, 380  $\mu\text{M}$ .

Os pressupostos de normalidade e de homocedasticidade são verificados, através dos testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene*. Os valores de significância para o teste de normalidade variam entre 0,025 e 0,547 e para o teste de homogeneidade de variâncias o valor de  $p$  é de 0,05.

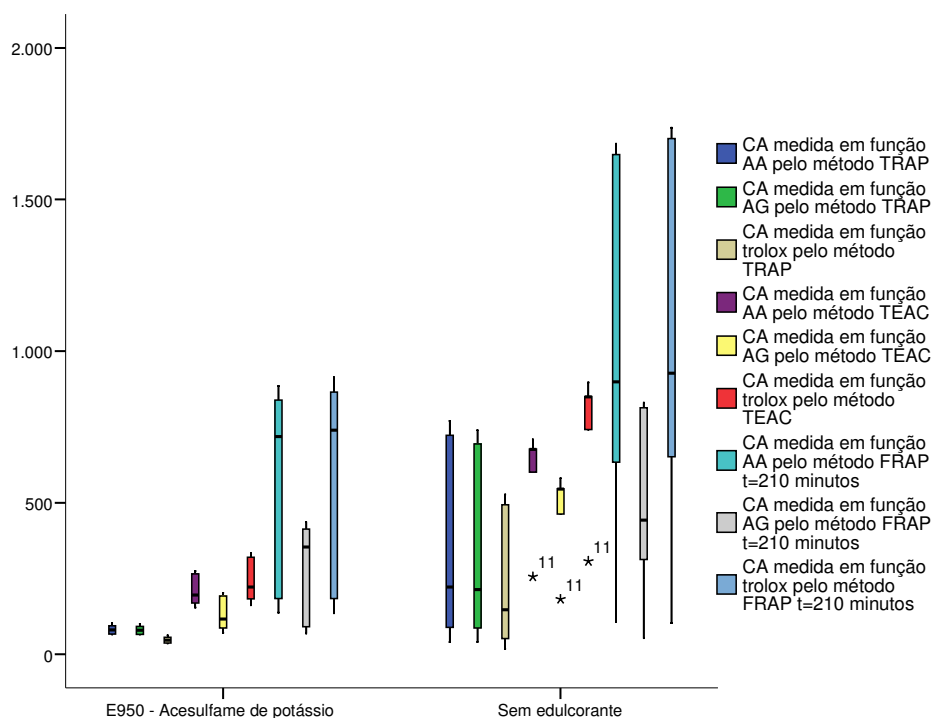


Figura 47 – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos aos edulcorantes, para as águas.

O teste Anova apresenta um valor de significância para o teste F de 0,057. Este valor de  $p$  indica a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre as águas com e sem edulcorante.

#### 3.3.3.4 Efeito dos conservantes

Quando existem conservantes as águas apresentam duas associações com dois conservantes cada. Na Figura 48 encontra-se a caixa de bigodes relativa às CA observadas, encontrando-se todos os parâmetros estatísticos correspondentes descritos na Tabela 79-E, Anexo E. Os valores médios variam entre 250 e 394  $\mu\text{M}$ , para as amostras com a associação de conservantes E202/E211 e sem conservantes, respectivamente. O valor mínimo e máximo são 0 e 1737  $\mu\text{M}$  e pertencem às amostras que não apresentam conservantes na sua constituição.

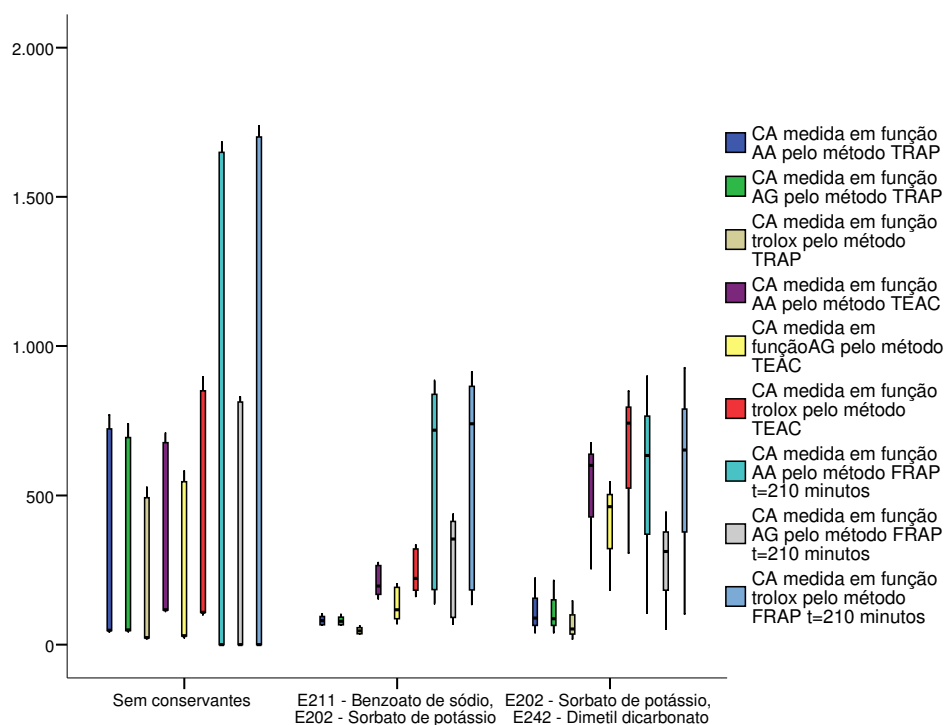


Figura 48 - Caixa de bigodes para os valores de CA relativos aos conservantes, para as águas.

Para todos os métodos e para todos os padrões verifica-se o pressuposto da normalidade ( $p > 0,01$ ) com valores compreendidos entre 0,01 para o método TRAP, sendo igual para todos os padrões, e 0,639 para o método FRAP, também para todos os padrões. Verifica-se o pressuposto da homocedasticidade, obtido através do teste de Levene. Os valores variância de CA das várias amostras são considerados estatisticamente semelhantes com um valor de significância de 0,01.

O teste Anova compara os valores médios obtidos entre vários grupos. Utiliza e indica, para o teste F, uma significância de 0,152. Os testes Post-Hoc, para o intervalo de confiança de 99%, concluem que não existe nenhum grupo que seja consideravelmente diferente, ver Tabela 80-E, Anexo E.

### 3.3.3.5 Efeito das vitaminas

As vitaminas, como já foi referenciado anteriormente, são substâncias que possuem propriedades antioxidantes e por isso são susceptíveis de aumentar os valores de CA. Só duas amostras da marca B possuem vitaminas, a água com aroma de limão e com aroma de maçã, amostras n.º 33 e 34. Na Figura 49, representa-se a caixa de bigodes relativa às vitaminas. De uma forma geral, o método FRAP é o que apresenta os valores mais elevados e dispersos.

Como os pressupostos de normalidade e homocedasticidade não se verificam, é necessário proceder à transformação dos valores de CA para LogCA. Após a transformação já se verificam estes pressupostos; os valores de significância para o teste de *Shapiro-Wilk* variam de 0,01 a 0,045, e para o teste de *Levene*  $p=0,198$ .

Os valores médios de LogCA variam entre 2,25, para as amostras que não contêm vitaminas e 2,42 para as que possuem. Na Tabela 81-E, Anexo E, encontra-se a tabela com os parâmetros estatísticos relativos às vitaminas.

O valor mínimo e máximo são 1,26 e 3,24, respectivamente, e pertencem às amostras sem vitaminas na sua constituição. Verificamos que as amostras 13 e 14 são observações aberrantes. Estas duas amostras são as que apresentam sempre os valores mais elevados de CA, independentemente do método e do padrão considerados.

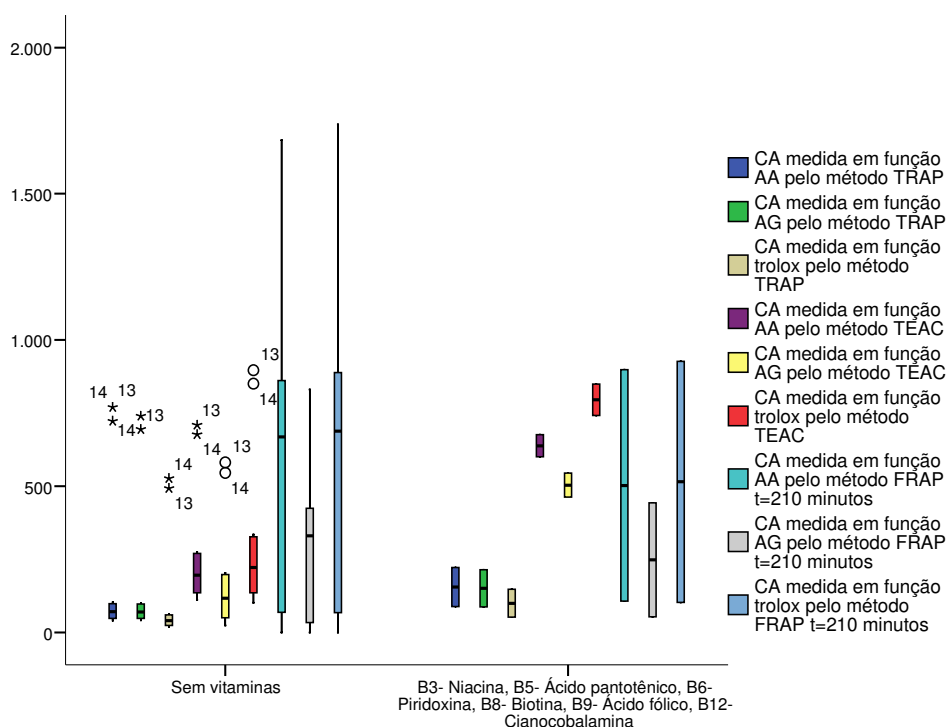


Figura 49 – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos às vitaminas, para as águas

O teste F fornece um valor de significância de 0,186, o que indica que nenhum dos grupos se destaca. Este resultado sugere a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre as águas com e sem vitaminas.

### 3.3.3.6 Efeito do antioxidante

As únicas amostras que possuem AA na sua constituição são as amostras n.º 37 e 38, águas aromatizadas da marca C. Como os pressupostos de normalidade e de homocedasticidade não se verificam procede-se à transformação dos valores de CA para LogCA. O teste de *Shapiro-Wilk* apresenta para a variável transformada um valor de significância de 0,01 e para o teste de *Levene* uma significância de 0,02.

Na Figura 50 representa-se a caixa de bigodes relativa aos grupos para o factor AO. As amostras 9 e 10, águas aromatizadas da marca B com aroma de limão e maçã, respectivamente, são observações aberrantes. As amostras que contêm AA, C limão e morango, são as que apresentam os maiores valores de CA. Os valores de FRAP para as amostras que não contêm AOs são os que apresentam os valores mais elevados e mais dispersos. Na tabela 82-E, Anexo E encontra-se a descrição dos parâmetros estatísticos. O valor mínimo é de 1,26, para as amostras sem AO, e o máximo é de 3,24 para as amostras com AO.

O teste F tem uma significância de 0,000, o que indica que os grupos são estatisticamente diferentes. Naturalmente, seria já esperado que o AO adicionado às amostras aumentasse a CA dessas amostras, originando um grupo estatisticamente diferente daquele sem AO.

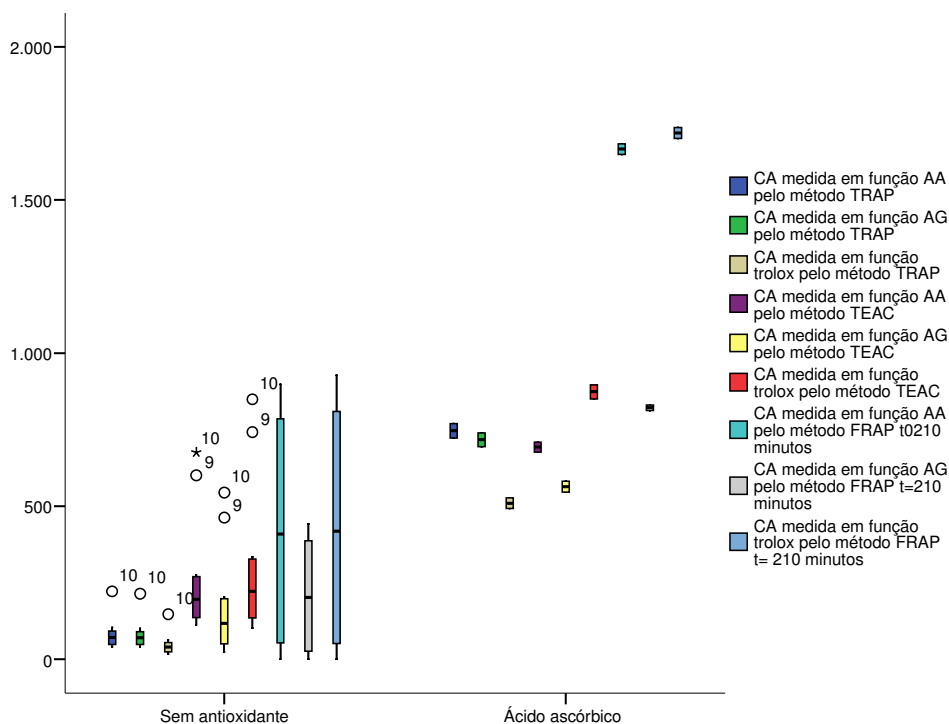


Figura 50 – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos aos antioxidantes, para as águas.

### 3.3.3.7 Efeito do método

Tal como o efectuado para os refrigerantes e os vinhos, o efeito do método é um parâmetro a analisar, visto que os valores de CA não são constantes para todos os métodos.

Os valores de CA foram transformados para logaritmo de CA pois os valores de CA tinham um nível de significância, para o teste de normalidade, inferior a 0,005. Na Tabela 83-E, Anexo E, encontram-se descritos os parâmetros estatísticos relativos aos métodos. Os valores médios de LogCA variam de 2,18 a 2,36. O valor mínimo é 1,26 para o FRAP e o máximo é 3,24 para o mesmo método. Na Figura 51, encontra-se a caixa de bigodes relativa a estes dados.

O teste de *Shapiro-Wilk*, indica uma significância de 0,195 e o teste de *Levene* uma significância de 0,274. Os pressupostos de normalidade e de homocedasticidade são assim verificados.

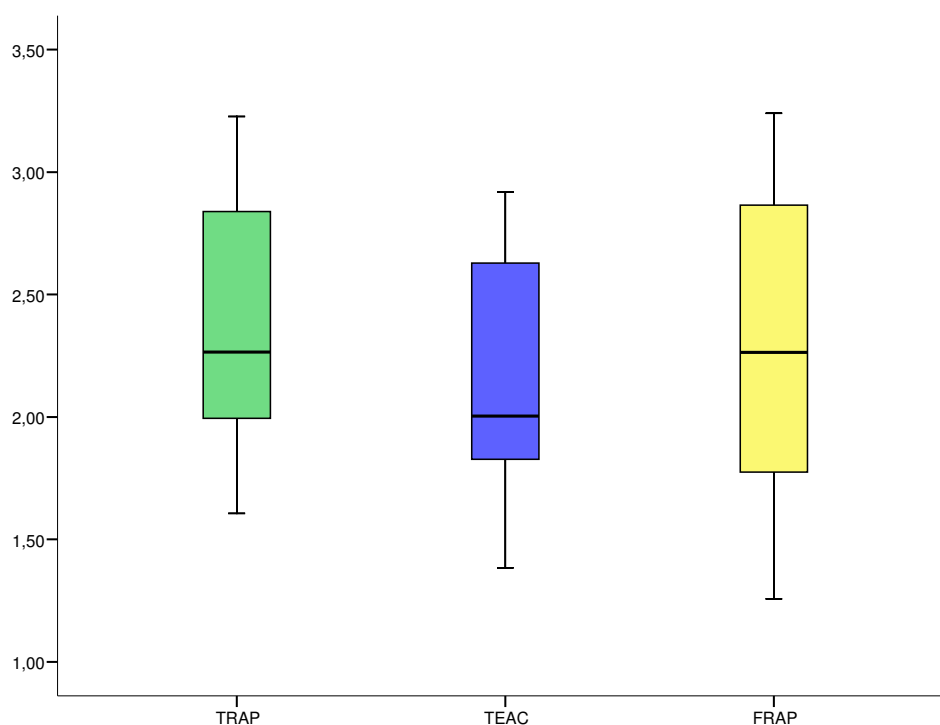


Figura 51 – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos ao método, para as águas.

O teste F origina uma significância de 0,274, o que indica que não há nenhum método que seja estatisticamente diferentes dos restantes. O teste Anova sugere, por isso, um único sub-conjunto homogêneo de médias (ver Tabela 84-E, Anexo E).



### 3.3.3.8 Efeito do padrão

O efeito do padrão é também um parâmetro a ter em conta já que os resultados de CA não são homogêneos em todos os padrões. Na impossibilidade de garantir a normalidade e homocedasticidade de todos os resultados, o estudo foi efectuado para valores de CA agrupados por métodos, ou seja, foi analisado o efeito do padrão em função do método TRAP, TEAC e FRAP. Mesmo assim, é necessário transformar os valores de CA para LogCA.

Os resultados relativos ao estudo do efeito do padrão para o TRAP estão representados na Figura 52. As amostras 13 e 14 são observações aberrantes. Os valores médios são mais elevados para o padrão Trolox e mais baixos para o AA. Na Tabela 85-E, Anexo E, encontram-se descritos os parâmetros estatísticos relativos aos três padrões. O valor mínimo, 1,61 regista-se para o TRAP e o máximo, 3,23 para o FRAP. Os valores médios variam entre 2,01 e 2,75.

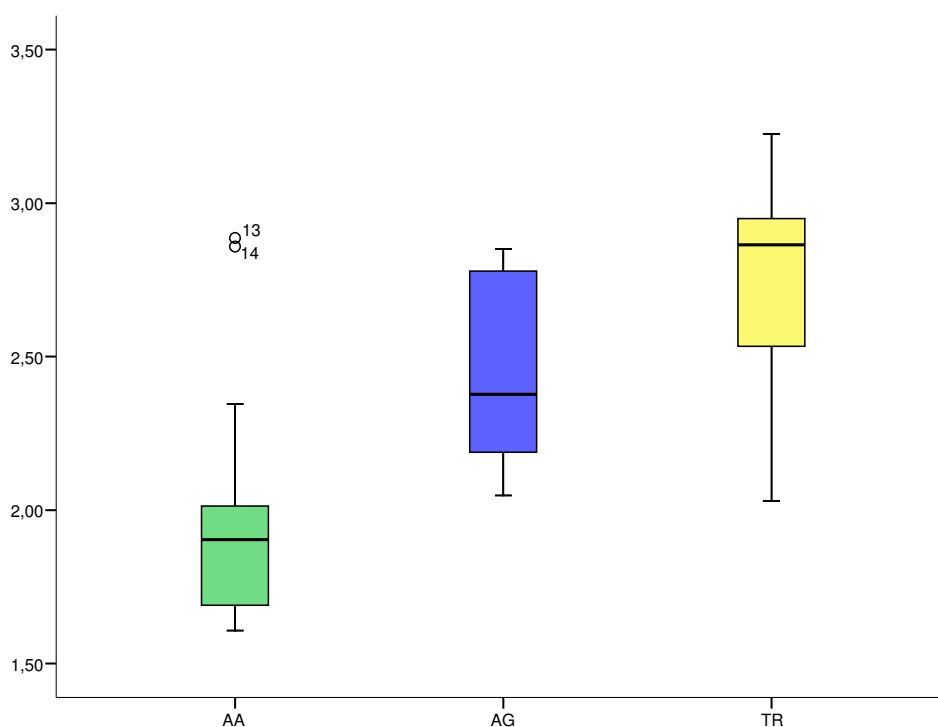


Figura 52 – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos ao padrão, para o método TRAP, para as águas.

Os pressupostos de normalidade são verificados, encontrando-se valores de  $p$  entre 0,01 e 0,051. O teste de homogeneidade de variâncias origina uma significância de 0,628.

Recorre-se ao teste F no Anova para apurar se algum dos padrões apresentava diferenças significativas dos restantes. O valor de  $p$  é de 0,000 o que indicia que pelo menos um dos padrões se destaca dos restantes. O teste Anova fornece 2 sub-conjuntos (ver Tabela 86-E, Anexo E) em que a média relativa do padrão AA é considerada estatisticamente diferente e inferior à média do padrão Trolox.

Relativamente ao efeito do padrão em relação ao método TEAC, também se transformam os valores de CA em logaritmo de CA. Os pressupostos de normalidade e de homocedasticidade são verificados pelos teste de *Shapiro-Wilk* e de *Levene*, respectivamente. Os valores de  $p$  para o teste de normalidade variam entre 0,01 e 0,183 e o valor de significância do teste de Levene é de 0,538.

Pela análise da Figura 53 (ver também Tabela 87-E, Anexo E) podemos concluir que as amostras 55 e 56 são observações aberrantes moderadas. Os valores mínimo e máximo médios variam entre 1,38 e 2,92. O padrão AG é o que apresenta a maior dispersão de valores. O padrão que apresenta o maior valor médio é o Trolox.

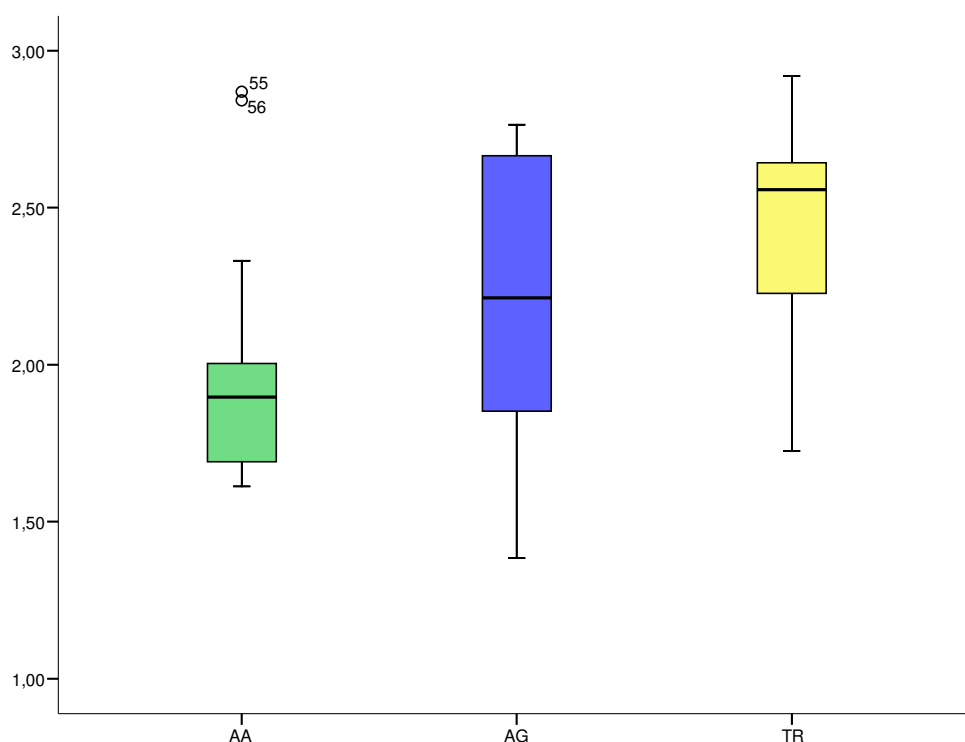


Figura 53 – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos ao padrão, para o método TEAC, para as águas.

O teste F do Anova indica um valor de significância de 0,054. O Anova só fornece um sub-conjunto homogêneo de médias, confirmando que nenhum dos padrões se destaca dos restantes (ver Tabela 88-E, Anexo E).

Finalmente a análise do efeito do padrão para o método FRAP revela, pela análise da caixa de bigodes representada na Figura 54, que o padrão AA parece ser significativamente diferente dos restantes. Na Tabela 89-E, Anexo E, estão descritos os valores estatísticos relativos ao efeito do padrão para o método FRAP. Os valores médios variam entre 1,26 e 3,24.

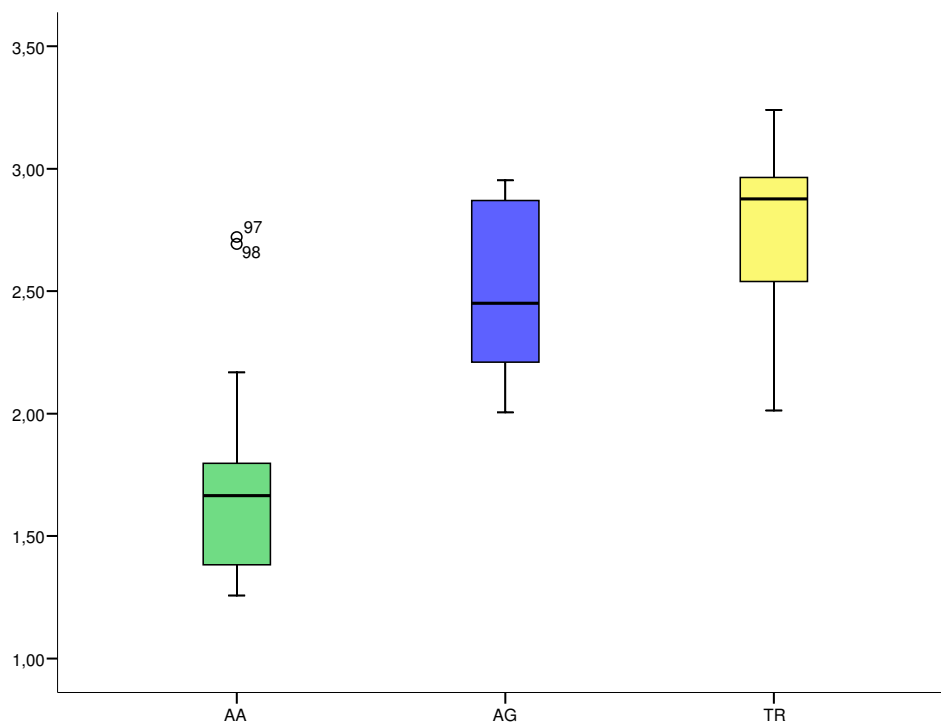


Figura 54 – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos ao padrão, para o método FRAP, para as águas.

Tal como para os métodos anteriores procede-se à transformação dos valores de CA para LogCA, para que os pressupostos de normalidade e homocedasticidade sejam verificados. Para o teste de *Shapiro-Wilk* os valores de significância variam entre 0,02 e 0,096. O teste de *Levene* apresenta uma significância de 0,822. O teste F indica um valor de  $p=0,000$ , permitindo concluir que pelo menos um dos padrões é estatisticamente diferente dos restantes. O teste Anova sugere 2 sub-conjuntos homogêneos de médias, indicando que os valores de CA fornecidos pelo AA são inferiores e estatisticamente diferentes dos produzidos pelos demais padrões (ver Tabela 90-E, Anexo E).

### 3.3.4 Cerveja

De todas as bebidas analisadas a cerveja é aquela que, independentemente do método e do padrão utilizado para análise, apresenta os maiores valores de CA. É portanto necessário proceder ao estudo da influência dos factores que podem determinar o valor da CA. Neste estudo são analisados os seguintes factores: marca, tipo de cerveja, presença de corantes, o teor de álcool, a cor da cerveja e o efeito do método e do padrão.

#### 3.3.4.1 Efeito da marca comercial

Este estudo contempla 8 marcas comerciais de cerveja: Super Bock, Sagres, Leffe, Grimberger, Auchan, Jumbo, Imperial e Tagus. Estas últimas quatro marcas apresentam apenas uma amostra neste estudo, pelo que foram omitidas da representação típica em caixa de bigodes (Figura 55). A presença destas apenas dificulta a apresentação dos resultados em forma gráfica (ver caixa de bigodes na Figura 27-F, Anexo F). O pressuposto de normalidade não é verificado para os valores de CA. Procede-se, por isso, a várias transformações, mas o valor de  $p$  é sempre inferior a 0,005. Visto que os valores de CA apresentam uma grande amplitude, variam entre 163 e 912652  $\mu\text{M}$  e que nenhum dos pressupostos permite a violação da normalidade, não é possível tirar conclusões em relação a este factor.

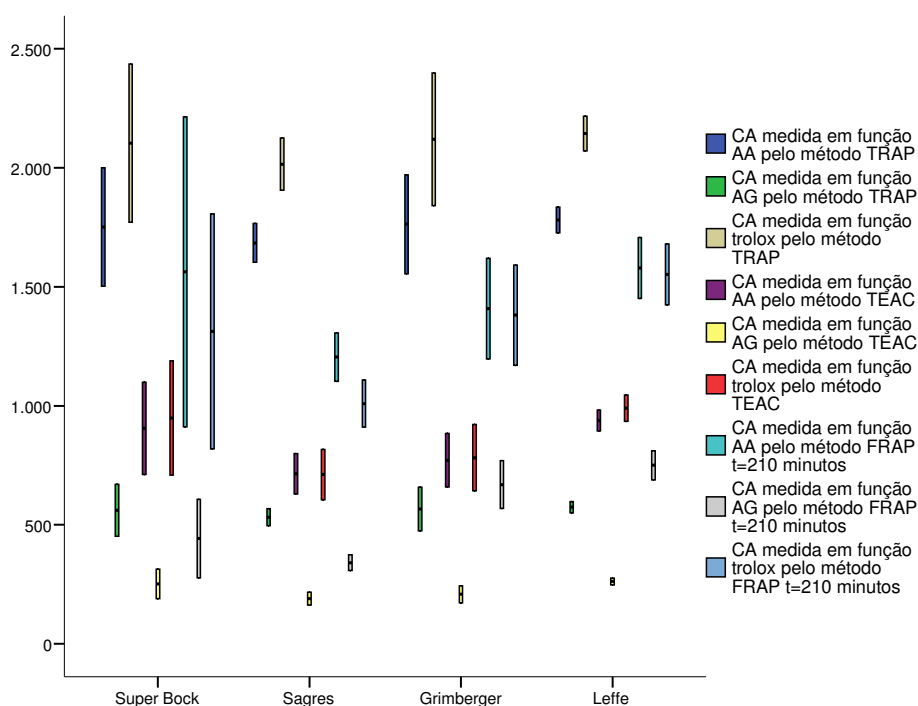


Figura 55 – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos à marca comercial, para as cervejas.

### 3.3.4.2 Efeito do tipo de cerveja

Quanto à cor, as cervejas podem classificar-se em claras ou escuras. Nesta análise existem 8 cervejas claras e 4 escuras. As marcas Super Bock, Sagres, Leffe e Grimberger possuem uma cerveja clara e uma escura, as restantes possuem só uma cerveja clara.

Na Figura 56, encontra-se a caixa de bigodes relativa à denominação das cervejas. Nesta figura os valores de FRAP são divididos, por 1000 de modo a permitir a comparação entre os métodos, na Figura 28-F, Anexo F, apresenta-se a caixa de bigodes original. A amostra 7 é uma observação aberrante moderada no grupo das cervejas claras para o método TEAC. O método FRAP é o que apresenta os valores mais elevados (de notar que nesta figura os valores de FRAP estão divididos por 1000). De uma forma geral, os valores de FRAP são também os mais dispersos.

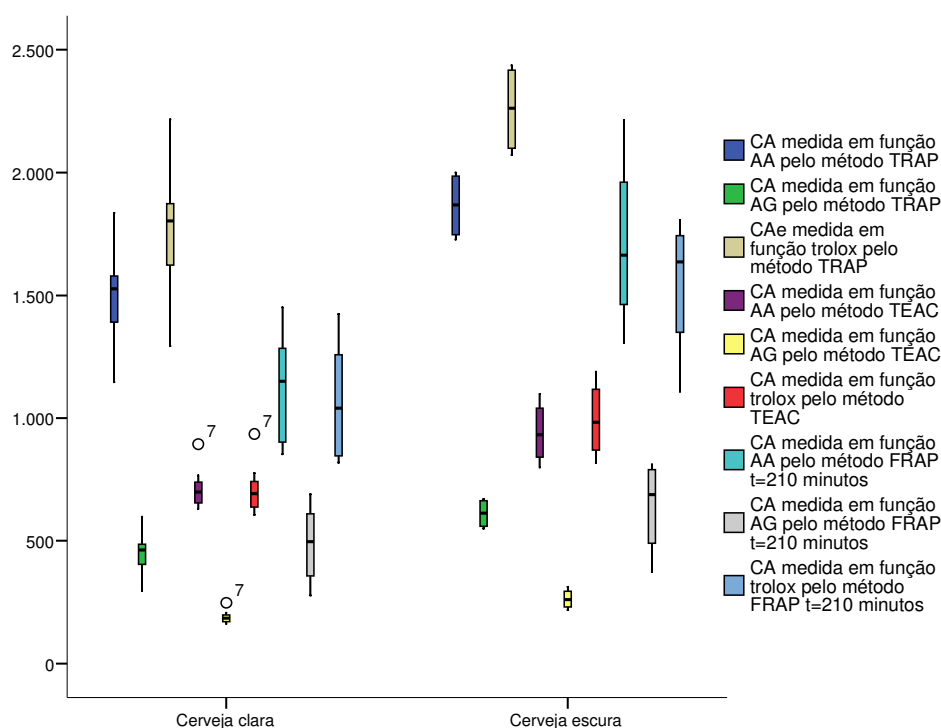


Figura 56 – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos à denominação, para as cervejas.

Na Tabela 91-F, Anexo F, encontram-se os parâmetros estatísticos relativos ao tipo de cerveja. Os valores médios são para as cervejas claras, 297854  $\mu\text{M}$  e para as escuras, 433922  $\mu\text{M}$ . Os valores mínimo e máximo são 163 e 2214550  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Antes de se apurar quaisquer conclusões a partir dos resultados observados verificaram-se previamente os pressupostos de normalidade e de homocedasticidade para aplicação do teste F do Anova. O teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* fornece valores de significância entre 0,113 e 0,948. O teste de *Levene* origina uma significância de 0,01. Realizado o teste F, os resultados indicam um valor de  $p=0,232$ , o que leva a concluir que nenhum dos dois grupos apresenta diferenças estatisticamente significativas entre si.

### 3.3.4.3 Efeito dos corantes

O único corante presentes nas amostras analisadas é o caramelo (E150). Só duas amostras possuem este corante, as amostras 40 e 43. Na Tabela 92, Anexo F, encontram-se descritos os parâmetros estatísticos relativos aos corantes. O valor médio mais elevado pertence às cervejas claras, sendo 420942  $\mu\text{M}$ . Os valores variam entre, 163 e 2214550  $\mu\text{M}$ . A Figura 29 mostra a caixa de bigodes original. Para facilitar a análise dos resultados apresenta-se uma caixa de bigodes onde os valores de FRAP foram divididos por 1000 (ver Figura 57). Verifica-se que as amostras que contêm caramelo apresentam os valores mais elevados de CA. Genericamente os valores fornecidos pelo método TRAP são mais elevados do que os do TEAC. O FRAP é que apresenta sempre os valores mais elevados, tanto para as amostras que contêm corantes como para as que não contêm.

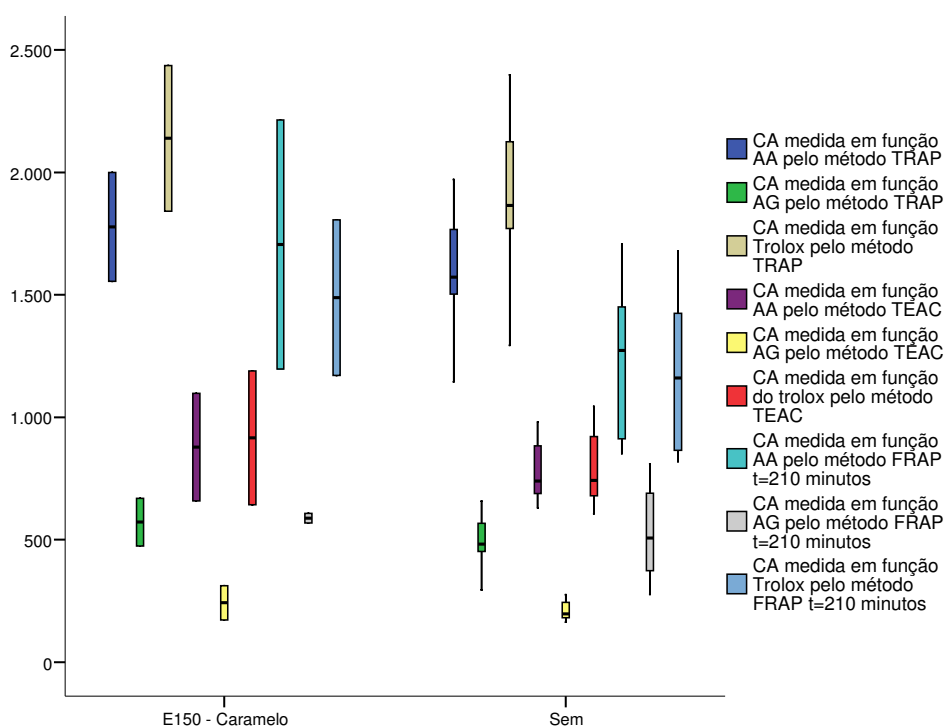


Figura 57 – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos aos corantes, para as cervejas.

Os pressupostos de normalidade e de homocedasticidade são verificados para estes resultados, os valores de significância do teste de normalidade variaram entre 0,273 e 0,923 e o do teste de homogeneidade de variâncias é de 0,126. O teste F do Anova apresenta uma significância de 0,518. Este resultado indica que os grupos constituídos não apresentam valores médios estatisticamente diferentes.

#### 3.3.4.4 Efeito do teor de álcool

O teor de álcool presente nas cervejas, varia de 4 a 10%. A representação em caixa de bigodes destes resultados é de difícil interpretação, dados os elevados valores decorrentes do método FRAP (ver Figura 30-F, Anexo F). Neste sentido, opta-se, novamente, pela divisão desse valor por 1000, originando a caixa de bigodes representada na Figura 58. Os valores de teores de álcool, 4, 6 e 10% são também retirados desta figura. A amostra 1 é uma observação aberrante para as amostras com 5% de teor de álcool. As amostras com um teor de álcool de 7%, apresentam de uma forma geral, valores de CA mais elevados do que as amostras que contêm 5% (ver Tabela 93-F, Anexo F).

Os testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene* originam valores  $p$  entre 0,018 e 0,997, para o teste de normalidad, e  $p=0,197$ , para o teste de homogeneidade de variâncias. Como estes pressupostos são verificados é possível aplicar o teste F do Anova para a comparação de médias. Este teste tem o valor de significância de 0,906. Através dos testes de *Post-Hoc* o Anova fornece um único sub-conjunto homogêneo (ver Figura 94-F, Anexo F).

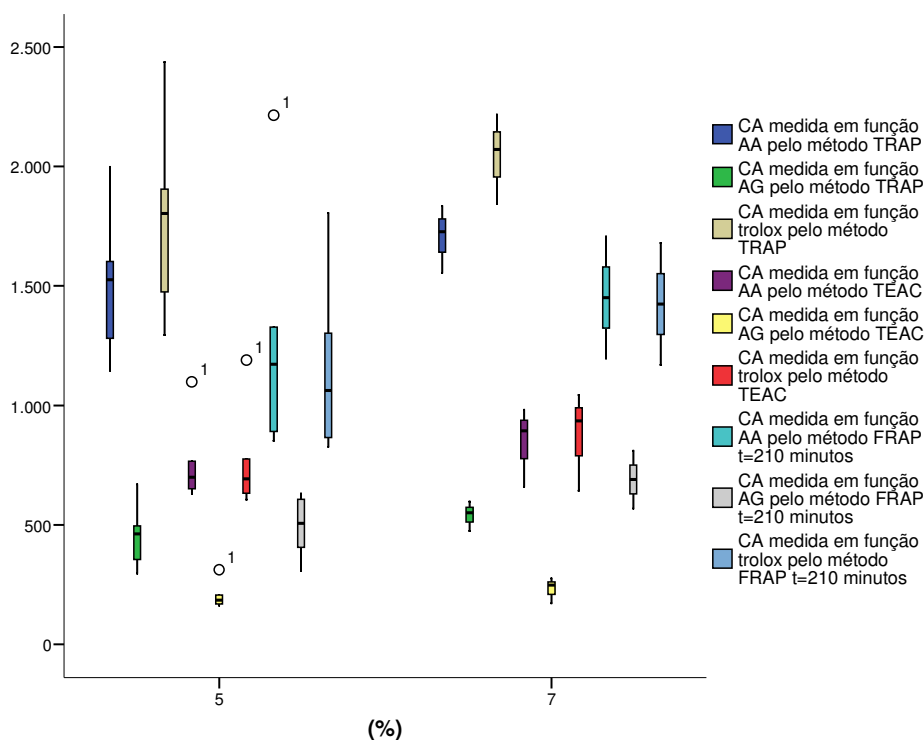


Figura 58 – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos ao teor de álcool, para as cervejas.

### 3.3.4.5 Efeito da cor

A cor da cerveja está directamente associada ao tipo de cerveja, visto que o tipo de cerveja é caracterizado pela sua cor da cerveja. O efeito da cor pode encontrar-se, por isso, associado ao efeito do tipo de cerveja. Na Figura 59 encontra-se a caixa de bigodes relativa ao efeito da cor. Os valores de FRAP são também aqui divididos por 1000. A caixa de bigodes original encontra-se na Figura 31-F, Anexo F. Todos os valores dos parâmetros estatísticos estão representados na Tabela 95-F, Anexo F. Os valores mínimo e máximo são 163 e 2214550  $\mu\text{M}$ . O valor médio mais elevado é de 433922  $\mu\text{M}$  e pertence ao grupo das amostras castanhas. Observa-se que a amostra 7, que representa a cerveja clara da marca Leffe, é uma observação aberrante moderada.



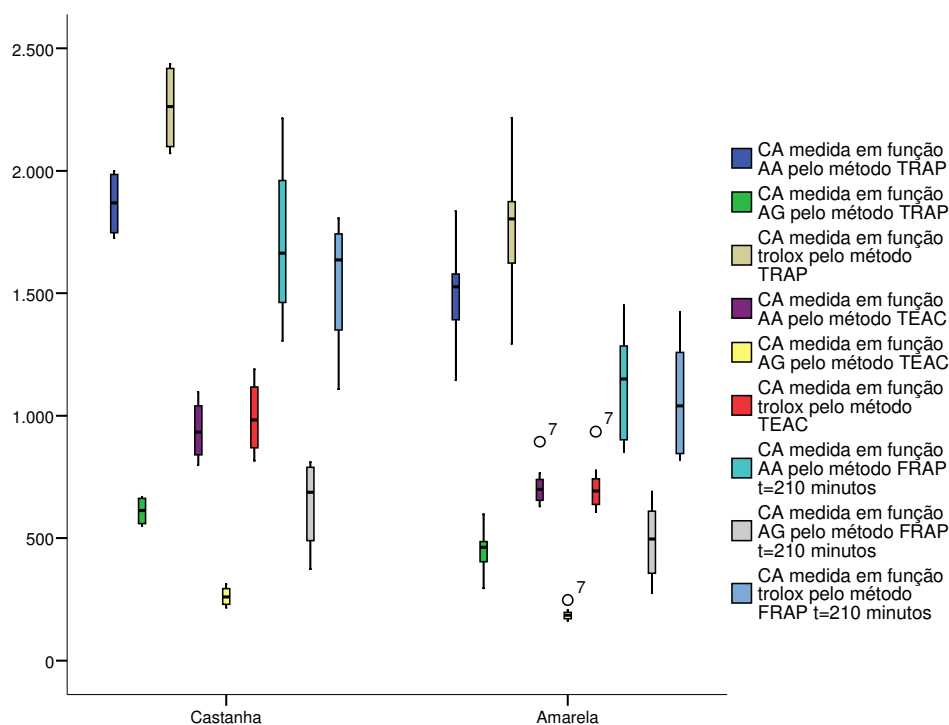


Figura 59 – Caixa de bigodes para os valores de CA relativos à cor, para as cervejas.

Ambos os pressupostos de normalidade e homocedasticidade são verificados. Os valores de significância para o teste de normalidade estão compreendidos entre 0,113 e 0,948. Já para o teste de *Levene*, o  $p$  tem o valor de 0,013. O Anova efectuou o teste F onde obteve uma significância de 0,232, indicando a ausência estatística de diferenças entre o grupo da cerveja castanha e o da cerveja amarela..

#### 3.3.4.6 Efeito do método

Na análise do efeito do método é necessário agrupar os valores de CA por padrão. Assim, primeiro analisa-se o efeito do método para o padrão de AA, seguidamente para o padrão AG e por último para o Trolox.

A Figura 60 mostra a caixa de bigodes para o efeito do método para o padrão de AA. Pode concluir-se que o método TEAC parece diferente dos outros dois métodos, porque nenhum dos valores do método TEAC, que compreendem a sua caixa de bigodes, é coincidente com o TRAP ou FRAP. Na Tabela 96-F, Anexo F, encontram-se os parâmetros estatísticos relativos a esta análise. Os valores médios variam de 504 a 1929  $\mu\text{M}$ . O valor mínimo e máximo são respectivamente, 296 e 2437  $\mu\text{M}$ .

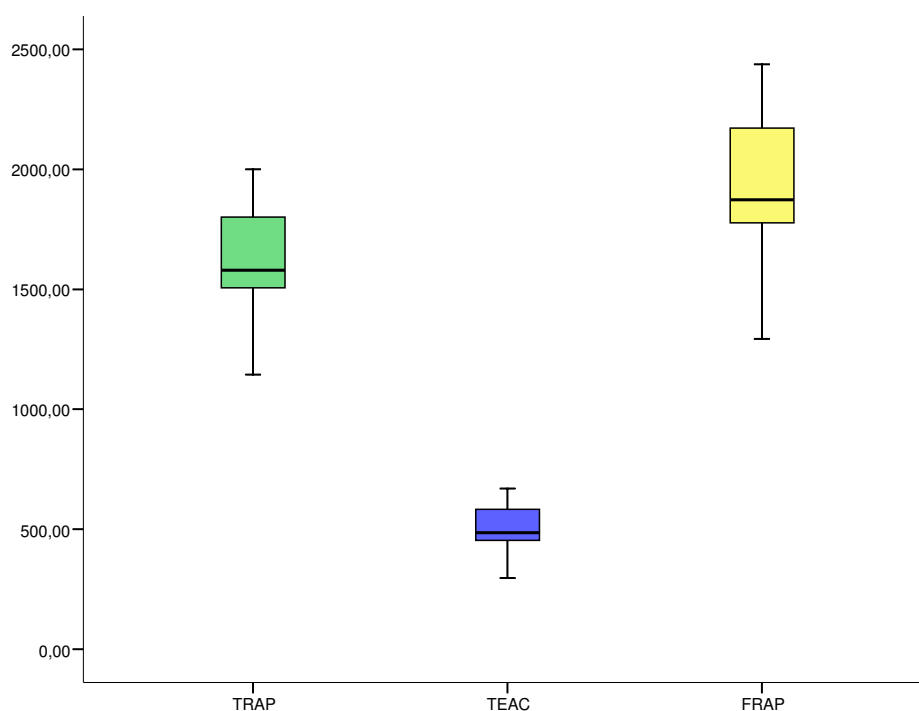


Figura 60 – Caixa de bigodes para os valores de CA, relativa ao efeito do método para o padrão de AA, para as cervejas.

O teste de *Shapiro-Wilk* fornece uma significância de 0,822 e o teste de *Levene* 0,018. Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade são verificados e a análise do teste F pode ser efectuada pelo Anova. Este teste tem uma significância de 0,000, o que nos indica que pelo menos um dos grupos é diferente dos restantes. Na Tabela 97-F, Anexo F, encontram-se os sub-conjuntos homogêneos que o Anova fornece. Existem dois sub-grupos, um que inclui o TRAP e FRAP e o outro com o TEAC. Pode afirmar-se que o TEAC é estatisticamente diferente dos outros dois métodos fornecendo os valores mais reduzidos de CA.

Relativamente ao efeito do método para o padrão de AG, na Figura 61 pode ver-se a caixa de bigodes relativa a esta análise. Mais uma vez verifica-se que o método TEAC apresenta os valores de CA mais baixos e menos dispersos. O valor máximo pertence ao método FRAP, sendo de 1190  $\mu\text{M}$ . Todos os parâmetros estatísticos correspondentes estão descritos na Tabela 98-F, Anexo F. Os valores médios de CA variam entre 214 e 805  $\mu\text{M}$ .

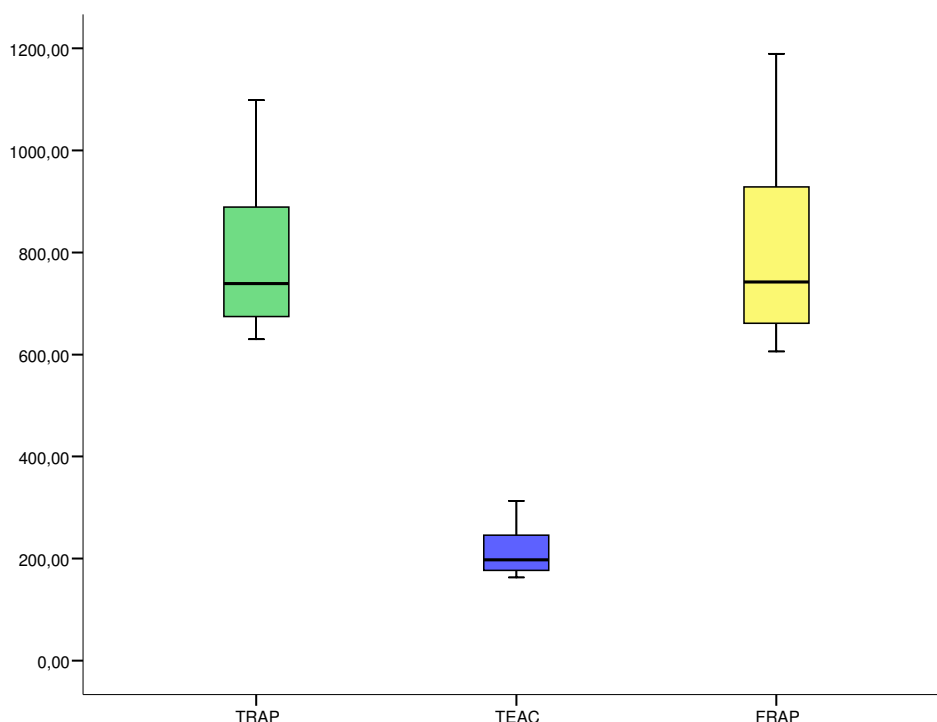


Figura 61 – Caixa de bigodes para os valores de CA, relativa ao efeito do método para o padrão de AG, para as cervejas.

O pressuposto de normalidade é verificado para um valor de  $p$  é igual a 0,171. O valor de significância do teste de *Levene* é 0,003. Como este valor é inferior a 0,005, o pressuposto de homocedasticidade não é verificado. Contudo, e baseado na dedução de Everitt e Brian, a homocedasticidade pode ser violada. O teste Anova, indicou um valor de significância para o teste F de 0,000, o que nos indica que pelo menos um dos grupos de amostras é diferente. Pela análise da Tabela 99-F, Anexo F, que descreve os subconjuntos homogêneos de médias, conclui-se que o método que apresenta diferenças estatisticamente significativas é, mais uma vez, o TEAC.

Finalmente na análise do efeito do método para o padrão Trolox, verifica-se que o método TEAC já não apresenta diferenças tão acentuadas. Na tabela, 100-F, Anexo F, estão descritos todos os parâmetros estatísticos relativos ao efeito do método para o padrão Trolox e a Figura 62 mostra a caixa de bigodes relativa ao efeito do método para o padrão Trolox. Os valores médios variam entre 537880 e 1318580  $\mu\text{M}$ , para o método TEAC e TRAP, respectivamente. O valor mínimo pertence ao TEAC e o máximo ao TRAP, sendo o valor mínimo, 276.876  $\mu\text{M}$  e o máximo, 2.214.550  $\mu\text{M}$ .

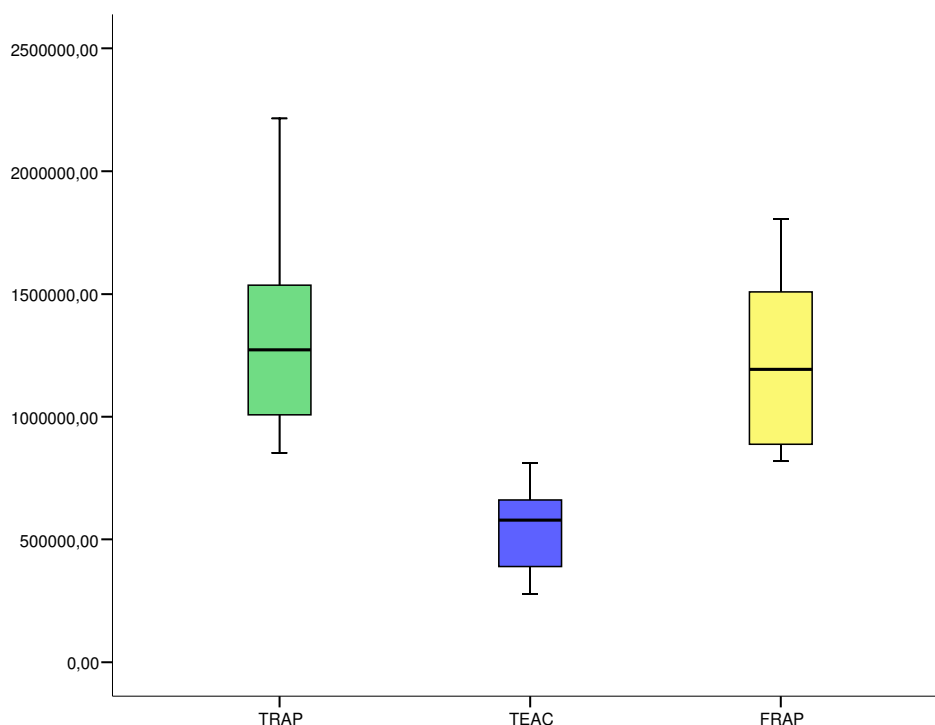


Figura 62 – Caixa de bigodes para os valores de CA, relativa ao efeito do método para o padrão de Trolox, para as cervejas.

O valor de  $p$  para o teste de *Shapiro-Wilk* varia de 0,606 a 0,336, pelo que o pressuposto de normalidade é verificado. Para verificar o pressuposto de homocedasticidade foi efectuado o teste de *Levene*, que teve uma significância de 0,143. Recorre-se ao Anova, por aplicação do teste F para o estudo de comparação de médias. O teste F origina um valor de  $p=0,000$ . Isto indica que existe pelo menos um grupo de amostras que se destaca dos restantes. O teste Anova propõe dois sub-conjuntos homogêneos (apresentados na Tabela 101-F, Anexo F). Mais uma vez se verifica que o TEAC apresenta diferenças estatísticas diferentes do TRAP e FRAP e fornece os valores de CA mais reduzidos.

### 3.3.4.7 Efeito do padrão

Tal como para o estudo do efeito do método, para ser possível a análise do efeito do padrão, é necessário agrupar os padrões pelos métodos. Assim analisou-se o efeito do padrão para o método TRAP, depois para o TEAC e por fim para o FRAP. Também se torna necessário transformar os valores de CA em logaritmo de CA, para que estes obedeçam aos pressupostos de normalidade e homocedasticidade.

A caixa de bigodes apresentada na Figura 63 representa os valores de LogCA para os três padrões, AA, AG e Trolox, para o método TRAP. Verifica-se que o padrão Trolox é significativamente diferente do AA e do AG. O padrão Trolox apresenta os valores mais elevados e mais dispersos. A amostra 12, representa uma observação aberrante moderada para o padrão AA. Na Tabela 102-F, Anexo F, encontram-se os parâmetros estatísticos relativos ao efeito do padrão para o método TRAP. Os valores médios variam entre 2,89 e 6,10. O valor mínimo pertence ao AG e o máximo ao Trolox e são respectivamente, 2,80 e 6,35.

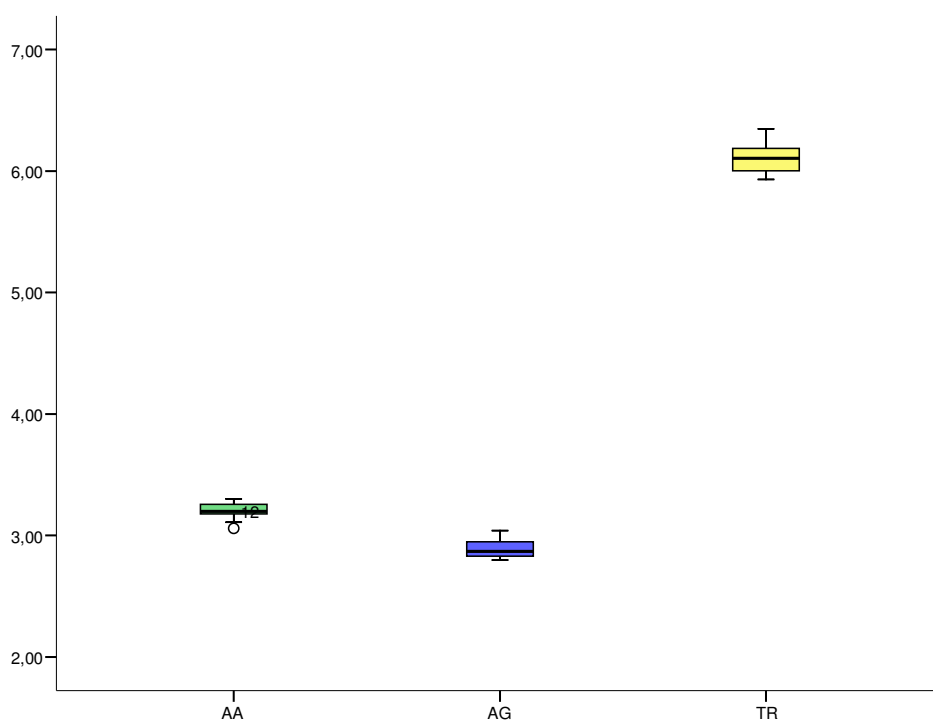


Figura 63 – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos ao padrão, para o método TRAP, para as cervejas.

Os valores de significância para o teste de normalidade variam entre 0,357 e 0,835. Para o teste de homogeneidade de variâncias  $p$  tem o valor de 0,185. O teste F do Anova indica um valor de significância de 0,000, o que revela que existe pelo menos um grupo de amostras que é diferentes dos outros. Na Tabela 103-F, Anexo F, encontram-se os sub-conjuntos homogêneos fornecidos pelo Anova. Pode observar-se que existem diferenças significativas entre os três padrões, visto que o Anova forneceu três sub-conjuntos.

A variável de CA transformada para a análise do efeito do padrão para o método TEAC encontra-se representada na Figura 64.

Os três padrões parecem apresentar diferenças significativas entre si, sendo que o Trolox apresenta as maiores diferenças (consultar valores na Tabela 104-F, Anexos F). Os valores médios variam entre 2,32 e 5,71. O valor mínimo é 2,21 para o AG e o máximo é de 5,91 para o Trolox.

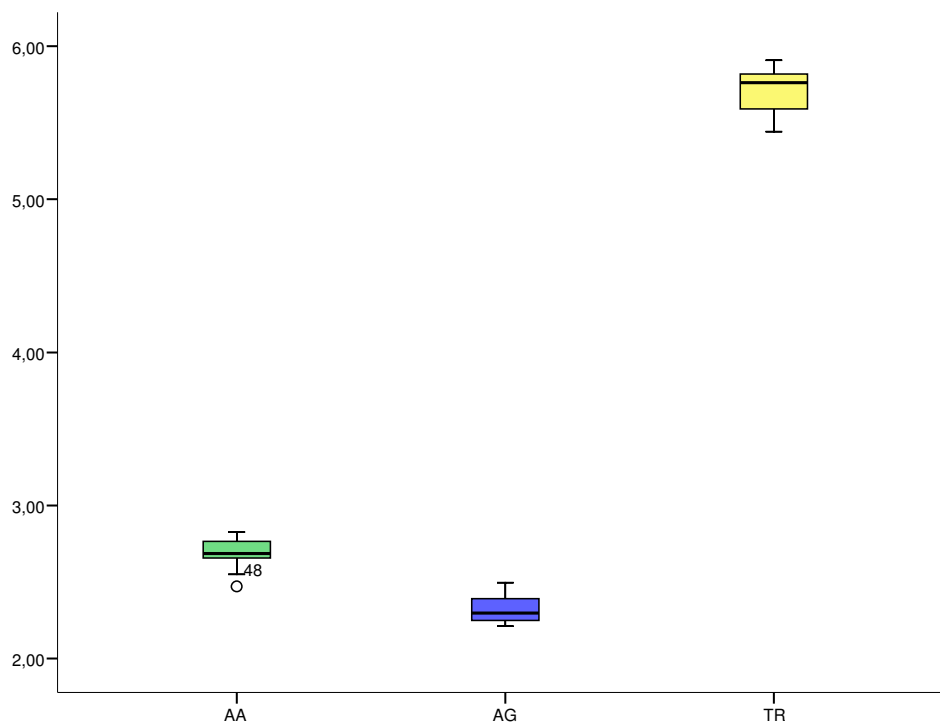


Figura 64 – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos ao padrão, para o método TEAC, para as cervejas.

Os testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene* são efectuados e originam valores de significância entre 0,397 e 0,439, para o teste de normalidade, e 0,043, para o teste de homogeneidade de variâncias. Procedeu-se assim com a análise de comparação de médias com a aplicação do teste F. O valor de  $p$  para este teste é de 0,000. Pela análise da Tabela 105-F, Anexos F, pode concluir-se que os três padrões apresentam diferenças significativas entre si.

A análise do efeito do padrão para o FRAP é efectuada de modo semelhante às anteriores. Os valores de CA são mais uma vez transformados em LogCA. Na Figura 65 representa-se a caixa de bigodes relativa ao efeito do padrão para o método FRAP. Os parâmetros estatísticos estão indicados na Tabela 106-F, Anexos F.

Os valores médios são, por ordem crescente; 2,90, 3,28 e 6,07 e correspondem aos padrões AG, AA e Trolox, respectivamente. O Trolox é o que apresenta os valores mais altos e mais dispersos.

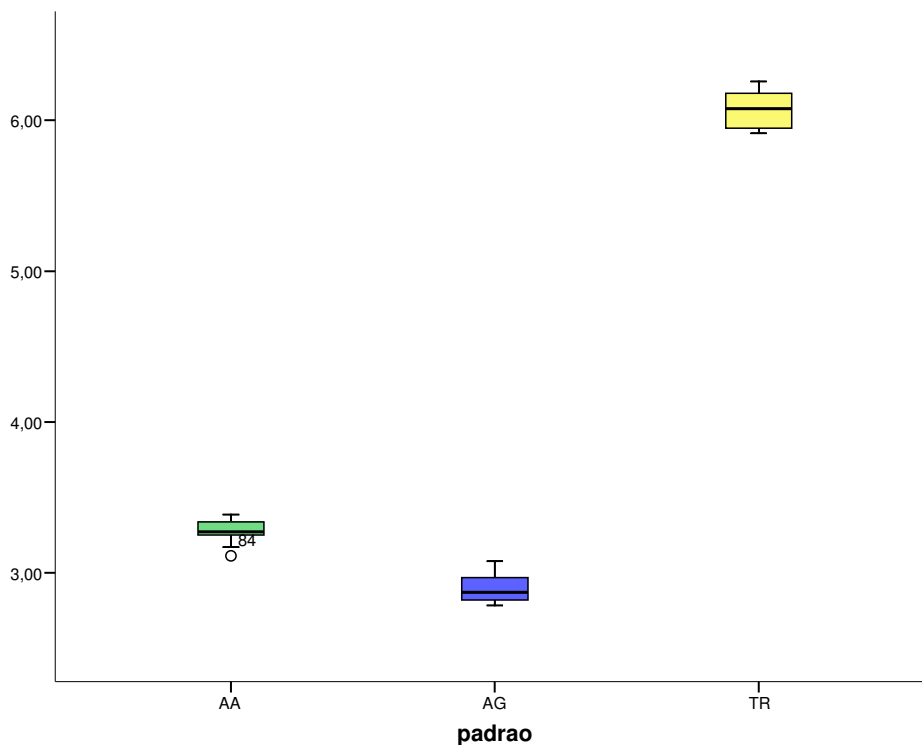


Figura 65 – Caixa de bigodes para os valores de LogCA relativos ao padrão, para o método FRAP, para as cervejas.

Os valores de significância para o teste de *Shapiro-Wilk* variam entre 0,379 e 0,551. O valor de  $p$  para o teste de *Levene* é igual a 0,228.

Mais uma vez o teste F do Anova apresenta um valor de  $p$  igual a 0,000. Na Tabela 107-F, Anexo F, estão descritos os três sub-conjuntos que o Anova fornece confirmando o comportamento já observado para os métodos anteriores. Genericamente, a utilização de padrões diferentes promove diferenças entre os resultados com significado estatístico.

## 4 Conclusões

Entre quatro tipos de bebidas analisadas, a cerveja é a bebida que apresenta os valores de CA mais elevados. A amostras n.º 40, uma cerveja Stout, é aquela que tem os valores de CA mais elevados, independentemente do método utilizado na análise e do padrão utilizado para a comparação. Comparando as cervejas claras com as escuras, verifica-se que as escuras apresentam, de uma forma geral, valores de CA mais altos do que a cerveja clara pertencente à mesma marca comercial. Fazendo a analogia da cor com o tipo de cerveja, concluiu-se que as cervejas que apresentam a coloração castanha são as que apresentam também os valores de CA mais elevados. Relativamente ao efeito da marca não é possível concluir sobre a sua influência na CA dada a elevada diversidade de resultados. Os factores cor, tipo, teor de álcool e corantes não justificaram quaisquer diferenças de CA observadas entre as amostras. Os estudos indicam que o método utilizado na análise é importante pois os valores de CA diferem de método para método; existem, para um intervalo de 99% de confiança, dois sub-conjuntos homogêneos de médias, em que os métodos TRAP e FRAP apresentam diferenças significativas do método TEAC. Em relação ao efeito do padrão, os três padrões utilizados, AA, AG e Trolox são estatisticamente diferentes entre si.

As amostras de vinho revelam que esta bebida apresenta, genericamente, elevada CA. A maioria dos valores de CA encontra-se na gama 7000-22000  $\mu\text{M}$ . O método que origina os valores mais elevados é o TEAC, apesar de não serem encontradas diferenças significativas entre os três métodos, ao contrário dos padrões que apresentam grandes diferenças entre si, sendo indicados três sub-conjuntos homogêneos de médias. Os outros factores analisados, tipo de vinho, teor de álcool e presença de gás, não parecem influenciar os resultados obtidos de CA.

As amostras de água são as que apresentam os valores de CA mais baixos. As águas naturais apresentam valores de CA muito baixos. Os valores médios mais elevados de CA são produzidos pelas amostras n.º 37 e 38, águas com aromas de morango e limão da marca C, para todos os métodos e padrões. Nos estudos estatísticos efectuados só se pode concluir a existência de diferenças estatisticamente significativas para os factores marca, padrão e AO. Para a marca a que se distingue é a marca C. Para os padrões existem diferenças significativas quando os métodos são o TRAP e o FRAP. O primeiro indica diferenças significativas entre os padrões AA e Trolox e os segundo indica diferenças entre o AA e os restantes padrões. Naturalmente, a presença de AOs favorece o aumento de CA das amostras.



Todos os outros factores estudados, aroma, edulcorantes, conservantes, vitaminas e método não produzem diferenças significativas nos valores de CA das amostras.

Quanto às bebidas refrigerantes, as amostras n.º 1, 5 e 9 apresentam os valores médios de CA mais elevados. Estas amostras são de refrigerantes de maçã sem gás. Os factores que parecem ser mais preponderantes em relação à CA são o aroma, o regulador de acidez, o teor de sumo, a cor da bebida e o método utilizado. Pode fazer-se a analogia teor de sumo/cor, visto que as cores das bebidas se associam a um teor de sumo específico. As bebidas de cor castanha, que são as que contêm 16% de teor de sumo de fruta, são as que apresentam diferenças estatisticamente significativas das restantes. Quanto ao regulador de acidez utilizado são encontrados dois sub-conjuntos homogêneos de médias, um que compreende o ácido málico e outro com o citrato de sódio e as amostras sem reguladores de acidez. Na avaliação do método concluiu-se que para os padrões AA e Trolox não conduzem a diferenças significativas entre os métodos, mas para o AG são encontrados três sub-conjuntos diferentes, um para cada método.

Este trabalho conclui, por isso, que existem no mercado várias bebidas que apresentam propriedades AOs muito diversas. Alguns aspectos da sua constituição podem ser determinantes para a obtenção de valores de CA superiores. No presente estudo, o sumo de maçã e a presença de ácido málico favorece a CA dos refrigerantes e a marca e a presença de AOs podem produzir águas aromatizadas de maior CA. Para os vinhos e as cervejas não se encontraram factores intrínsecos que originam aumento ou decréscimo de CA. Genericamente, o método e o padrão utilizados podem produzir resultados diferentes, ou não, dependendo das amostras consideradas.

## 5 Referências Bibliográficas

- [1] [http://www.marketineros.com/antioxidant/antioxidant\\_drink.HTM](http://www.marketineros.com/antioxidant/antioxidant_drink.HTM).
- [2] Beal, B. H., *Atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos de gengibre*, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2006.
- [3] Castro e Silva, J. P. M., Soares, J. P. M., *Efeitos de novos compostos azotados com potencial farmacológico na proteção do stresse oxidativo*, Universidade do Minho, Escola de Ciências, Braga, 2004.
- [4] Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. F., Benfato, M. S., Manfredini, V., Kubota, L. T., *Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação*, Química Nova, 30, 1323-1338, 2007.
- [5] [http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/ag\\_oxid\\_antioxid.pdf](http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/ag_oxid_antioxid.pdf).
- [6] [www.corujando.com.br/arquivo/alzheimer09.htm](http://www.corujando.com.br/arquivo/alzheimer09.htm).
- [7] [www.anna-aslan.com.br/curitiba/medicina](http://www.anna-aslan.com.br/curitiba/medicina).
- [8] Benzie, Iris F. F., Strain, J. J., *The ferric reducing ability of plasma (Frap) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*, Analytical Biochemistry 239, 70-76, 1996.
- [9] [www.scielo.br/img/revistas/rbcf/v43n2/01f4.gif](http://www.scielo.br/img/revistas/rbcf/v43n2/01f4.gif).
- [10] <http://acessibilidade.unicer.pt/gca/index.php?id=7>.
- [11] Decreto-Lei N.º 156/98 de 6 de Junho.
- [12] Portaria N.º 703/96 de 6 de Dezembro.
- [13] Portaria N.º 620/90 de 3 de Agosto

[14] [http://www.ibesa.pt/gd/\\$documentos/cervejaesaude\\_19jul2002\\_id16.pdf](http://www.ibesa.pt/gd/$documentos/cervejaesaude_19jul2002_id16.pdf).

[15] <http://www.brasilecola.com/curiosidades/historia-do-refrigerante.htm>.

[16] Decreto-Lei N.º 363/98 de 19 de Novembro.

[17] Directiva 94/35/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 30 de Junho de 1994.

[18] [http://pt.wikipedia.org/wiki/Vinho#O\\_vinho\\_e\\_a\\_sa.C3.BAde](http://pt.wikipedia.org/wiki/Vinho#O_vinho_e_a_sa.C3.BAde).

[19] [http://www.uvibra.com.br/vinhoesaude\\_34.htm](http://www.uvibra.com.br/vinhoesaude_34.htm).

[20] Pestana, M. H., Gageiro, J. N., *Análise de dados para ciências sociais, a complementariedade do SPSS*, 4ª Edição, Edições silabo, capítulos 1 e 3, Lisboa, 2005.